

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Magdalena Valenta

Konstrukcija vektora za stvaranje transgeničnog miša s
bioluminiscentnim i fluorescentnim neuronima

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te na Odsjeku za neurogenetiku, medicinsku genetiku i razvojnu neuroznanost pri Hrvatskom institutu za istraživanje mozga na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Aleksandra Vojte i prof. dr. sc. Srećka Gajovića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Zahvaljujem mentorima, doc. dr. sc. Aleksandru Vojti i prof. dr. sc. Srećku Gajoviću, na ukazanom povjerenju, savjetima te izdvojenom vremenu za rasprave pri eksperimentalnom dijelu te pisanju ovog diplomskog rada.

Hvala Sandri Grgić, Željki Punčec te Dunji Gorup s Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, te Josipu Maduniću i Mariji Klasić sa Zavoda za molekularnu biologiju na pomoći pri eksperimentima. Posebno hvala Vanji Tadić na pomoći pri radu u laboratoriju, ustupljenim protokolima i savjetima te na dostupnosti i ljubaznosti.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Konstrukcija vektora za stvaranje transgeničnog miša s bioluminiscentnim i fluorescentnim neuronima

Magdalena Valenta

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Genetički preinačene životinje nužni su modeli za razumijevanje ljudskih bolesti na razini cijelog organizma. Miš s bioluminiscentnim i fluorescentnim neuronima bio bi važan model za proučavanje oštećenja i obnove mozga. Transgenične životinje s bioluminiscentnim i fluorescentnim signalom mogu se koristiti za praćenje molekularnih procesa *in vivo*, a označene stanice se mogu izolirati i služiti kao model za istraživanja *in vitro*. U ovom radu je opisana konstrukcija vektora s transgeničnom kazetom koja sadrži mišji promotor teške podjedinice neurofilamenata (NFH, od engl. *neurofilament heavy*) te gen reporter s bioluminiscentnim i fluorescentnim svojstvima, TurboLuc. Ekspresija reporterskog proteina s konstruiranog plazmida zabilježena je u diferenciranim neuralnim matičnim stanicama. Navedeni plazmid je stoga korišten za dobivanje nove transgenične linije mikroinjekcijom u pronukleus oplođene jajne stanice. Nakon selekcije, nosioci transgena, budući osnivači transgeničnih mišjih linija, snimljeni su optički *in vivo* te je kod njih utvrđena prisutnost bioluminiscentnog signala. Daljnja karakterizacija novih transgeničnih linija ukazat će je li signal specifičan za terminalno diferencirane neurone. Ovakav mišji model bi bio pogodan za *in vitro* istraživanje diferencijacije neuralnih matičnih stanica, te *in vivo*, u praćenju matičnih stanica nakon transplantacije u oštećeno područje mozga.

(58 stranica, 19 slika, 5 tablica, 57 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: neurofilamenti, *Nefh*, TurboLuc, luciferaza, Luc2, TurboFP635, neuralne matične stanice

Voditelji: doc. dr. sc. Aleksandar Vojta
prof. dr. sc. Srećko Gajović

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Aleksandar Vojta
doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević
doc. dr. sc. Romana Gračan

Rad prihvaćen: 19. 9. 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Construction of a vector for the creation of transgenic mouse with bioluminescent and fluorescent neurons

Magdalena Valenta

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Genetically modified animals are essential models for studying human diseases at the whole-organism level. A mouse with bioluminescent and fluorescent neurons would be a useful model for studies of brain repair after injury. Transgenic animals with fluorescent or bioluminescent signal can be used for *in vivo* optical imaging. In addition, transgenic animals can be a source of labelled population of cells for *in vitro* experiments. This thesis describes the construction of a vector with a transgenic cassette composed of mouse NFH (neurofilament heavy) promoter and a reporter gene with bioluminescent and fluorescent properties, TurboLuc. TurboLuc expression from constructed plasmid was detected during neural stem cells differentiation. Subsequently, the constructed plasmid was used for generation of novel transgenic mouse line by pronuclear microinjection. The new-born pups were genetically screened and transgenic carriers were selected. Bioluminescent signal was detected in transgenic animals using *in vivo* optical imaging. Future experiments would indicate if the signal from the reporter is specific for terminally differentiated neurons. The novel transgenic mouse could be appropriate for the research of differentiation of neural stem cells, both *in vitro* and *in vivo*. This would provide an insight in the effect of neural stem cells transplantation in the disease-affected brains.

(58 pages, 19 figures, 5 tables, 57 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Key words: neurofilaments, neurofilament heavy, *Nefh*, TurboLuc, luciferase, Luc2, TurboFP635, neural stem cells

Supervisors: dr. sc. Aleksandar Vojta, Assist. Prof.
dr. sc. Srećko Gajović, Prof.

Reviewers: dr. sc. Aleksandar Vojta, Assist. Prof.
dr. sc. Sofia Ana Blažević, Assist. Prof.
dr. sc. Romana Gračan, Assist. Prof.

Thesis accepted: 19. 9. 2018.

Popis kratica

ALS amiotrofična lateralna skleroza

ATP adenzin trifosfat

bFGF bazični faktor rasta fibroblasta (od engl. *basic fibroblast growth factor*)

bGH goveđi hormon rasta (od engl. *bovine growth hormone*)

CCD engl. *charge-coupled device*

CD2 engl. *cluster of differentiation 2*

CMV citomegalovirus

CRISPR/Cas9 engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9*

CTCF engl. *corrected total cell fluorescence*

DCR engl. *dominant control region*

EGF epidermalni faktor rasta (od engl. *epidermal growth factor*)

EGFP poboljšani zeleni fluorescentni protein (od engl. *enhanced green fluorescent protein*)

FBS fetalni goveđi serum (od engl. *fetal bovine serum*)

FOV vidno polje (od engl. *field of view*)

GFP zeleni fluorescentni protein (od engl. *green fluorescent protein*)

gRNA engl. *guide RNA*

HIRI homologna ilegitimna nasumična ugradnja (od engl. *homologous illegitimate random integration*)

kb kilobaza

LCR engl. *locus control region*

Luc2 luciferaza 2

MAR engl. *matrix-attachment region*

Nefh mišji gen za tešku podjedinicu neurofilamenata (od engl. *neurofilament heavy*)

Nefl mišji gen za laku podjedinicu neurofilamenata (od engl. *neurofilament light*)

NEPs neuroepitelne progenitorne stanice (od engl. *neuroepithelial progenitor cells*)

NFH teška podjedinica neurofilamenata (od engl. *neurofilament heavy*)

NFL laka podjedinica neurofilamenata (od engl. *neurofilament light*)

NFM srednja podjedinica neurofilamenata (engl. *neurofilament medium*)

NK negativna kontrola

NSCs neuralne matične stanice (od engl. *neural stem cells*)

NTP nukleozid trifosfat

Pax6 engl. *paired box 6*

pb parova baza

PBS fosfatni puffer (od engl. *phosphate buffered saline*)

PCR lančana reakcija polimerazom (od engl. *polymerase chain reaction*)

SAR engl. *scaffold-attachment region*

SV40 engl. *simian virus 40*

Ta temperatura vezanja početnica (engl. *annealing temperature*)

TALEN engl. *transcription activator-like effector nuclease*

Tbr2 engl. *T-box brain protein 2*

Tg transgenik

Tm temperatura denaturacije početnica (engl. *melting temperature*)

WT divlji tip (od engl. *wild type*)

ZFN nukleaza s motivom cinkovih prstiju (od engl. *zinc-finger nuclease*)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Genetički modificirani miševi	1
1.1.1. Transgenični miševi	1
1.2. Metode dobivanja transgeničnih miševa	1
1.2.1. Mikroinjektiranje u pronukleus	1
1.2.1.1. Dizajn transgeničnog konstrukta	4
1.2.1.2. Regulacija ekspresije transgena	6
1.2.1.3. Nasljeđivanje transgena i uspostavljanje stabilne transgenične linije	7
1.2.2. Druge metode dobivanja transgeničnih miševa	7
1.3. Neurofilamenti	9
1.3.1. Teška podjedinica neurofilamenata	10
1.4. Optičko snimanje malih laboratorijskih životinja	10
1.4.1. Snimanje fluorescencije	10
1.4.2. Snimanje bioluminiscencije	11
1.4.3. TurboLuc	11
1.5. Neuralne matične stanice	12
1.5.1. Terapija neuralnim matičnim stanicama	12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	14
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Materijali	15
3.2. Metode	17
3.2.1. Provjera početnih plazmida restrikcijskom digestijom	17
3.2.2. Konstrukcija plazmida s transgeničnom kazetom	17
3.2.2.1. Umnažanje komponenata plazmida lančanom reakcijom polimerazom	17
3.2.2.2. Pročišćavanje produkata PCR-a	18
3.2.2.3. Restrikcija produkata PCR-a	18
3.2.2.4. Ligacija	18
3.2.2.5. Transformacija kemijski kompetentnih bakterijskih stanica metodom temperaturnog šoka	19
3.2.2.6. Provjera sekvence konstrukta	19
3.2.2.6.1. PCR na bakterijskim kolonijama (<i>colony PCR</i>)	19
3.2.2.6.2. Izolacija plazmida za sekvenciranje (<i>mini prep</i>)	20
3.2.2.6.3. Sekvenciranje konstrukata Sangerovom metodom	20
3.2.2.6.4. Restriksijska digestija	20
3.2.3. Izolacija konstrukata (<i>maxi prep</i>)	20

3.2.4. Održavanje stanica HEK293 i L-929 u staničnoj kulturi.....	21
3.2.5. Održavanje stanica SH-SY5Y u staničnoj kulturi.....	21
3.2.6. Transfekcija staničnih linija HEK293, L-929 i SH-SY5Y.....	22
3.2.7. Održavanje primarnih neuralnih matičnih stanica u staničnoj kulturi	22
3.2.8. Transfekcija primarnih neuralnih matičnih stanica	22
3.2.9. Optimizacija transfekcije neuralnih matičnih stanica metodom magnetofekcije	23
3.2.10. Transfekcija diferenciranih neuralnih matičnih stanica.....	24
3.2.11. Analiza intenziteta fluorescencije	24
3.2.12. Pronuklearna injekcija.....	24
3.2.13. Genotipizacija.....	25
3.2.13.1 Optimizacija lančane reakcije polimerazom za genotipizaciju osnivača	25
3.2.13.2. Izolacija genomske DNA iz biopsija miševa.....	26
3.2.13.3. Genotipizacija (lančana reakcija polimerazom i gel elektroforeza PCR produkata na agaroznom gelu)	27
3.2.14. Optičko snimanje biolumiscencije <i>in vivo</i>	27
4. REZULTATI	28
4.1. Konstruirani plazmid sadrži reporter TurboLuc pod kontrolom promotora NFH.....	28
4.2. Fluorescentni signal proteina TurboLuc nije zabilježen nakon transfekcije konstrukta u stanične linije HEK293, L-929 i SH-SY5Y.....	31
4.3. Optimizacija magnetofekcije reagensom NeuroMag pokazuje kako veća količina DNA i reagensa povećava učinkovitost metode	32
4.4. Ekspresija proteina TurboLuc s plazmida pNFH-TurboLuc dobivena je u diferenciranim neuralnim matičnim stanicama	35
4.5. Genotipizacijom je utvrđeno postojanje tri osnivača transgenične linije.....	40
4.6. Osnivači pokazuju bioluminiscentni signal na lokaciji središnjeg živčanog sustava te perifernih živaca.....	41
5. RASPRAVA	43
5.1. Izazovi uporabljenih tehnologija	43
5.1.1. Ograničenja korištenih <i>in vitro</i> modela.....	43
5.1.2. Ograničenja odabrane metode genotipizacije osnivača transgenične linije	44
5.1.3. Procjena uspješnosti mikroinjektiranja u pronukleus.....	44
5.2. Specifičnost ekspresije proteina TurboLuc s plazmida pNFH-TurboLuc za neurone	45
5.3. Daljnja karakterizacija i primjena novostvorenog miša	47
6. ZAKLJUČAK	49
7. LITERATURA	50
8. PRILOZI	54
9. ŽIVOTOPIS	58

1. UVOD

1.1. Genetički modificirani miševi

Životinje dobivene preinakama u genomu neizostavan su model u mnogim istraživanjima ljudskih bolesti (Doyle i sur. 2012). Mišji modeli su relativno jeftini te laki za održavanje i sparivanje (Kumar i sur. 2009). Obzirom na postojanje visoko srođenih mišjih linija, svi miševi korišteni u pojedinom istraživanju genetički su istovjetni te se uzgajaju u jednakim standardiziranim uvjetima. Kratko generacijsko razdoblje omogućava brzo generiranje velikog broja eksperimentalnih životinja. Uz to, fiziološke i biokemijske sličnosti između miševa i ljudi čine miševe prikladnima za mnoga istraživanja (Doyle i sur. 2012).

Visoko srođeni sojevi (engl. *inbred strains*) dobiveni su početkom 20. stoljeća križanjima u srodstvu. Daljnjim križanjima dobivene su linije podložne određenim bolestima te one koje su rezistentne na njih (Ericsson i sur. 2013). Od 1980-ih postupci preinake genoma omogućavaju stvaranje novih mišjih modela koje do tada nije bilo moguće dobiti križanjima i selekcijom (Ericsson i sur. 2013). Mogućnost unošenja stranih strukturnih ili regulatornih sekvenci (transgena) u mišji genom, kao i mogućnost modificiranja specifičnog endogenog mišjeg gena (engl. *knock-out/knock-in*), dovele su do veće uporabe miševa u biomedicinskim istraživanjima (Doyle i sur. 2012). Današnja tehnologija omogućava utišavanje ekspresije gena u određenom razvojnom stadiju ili u odabranom tkivu, utišavanje ili indukciju genske ekspresije u inducibilnim sustavima te obilježavanje i praćenje odabrane populacije stanica *in vivo* (Ericsson i sur. 2013).

1.1.1. Transgenični miševi

Godine 1976. dobiven je prvi transgenični miš, a 1981. uveden je pojam transgenika za miša dobivenog uvođenjem sekvenci DNA u genom (Ericsson i sur. 2013, Rüllicke i Hübscher 2000). Od tada je opisano nekoliko stotina transgeničnih linija miševa s ekspresijom stranih gena, dizajniranih za označavanje ciljanih organela, stanica ili organa (Kumar i sur. 2009). Označavanje genom reporterom omogućava praćenje stanica kroz različite razvojne stadije te proučavanje diferencijacije stanica. Kao reporteri koriste se β -galaktozidaza, alkalna fosfataza te fluorescentni i bioluminiscentni biljezi (Kumar i sur. 2009, Mezzanotte 2014).

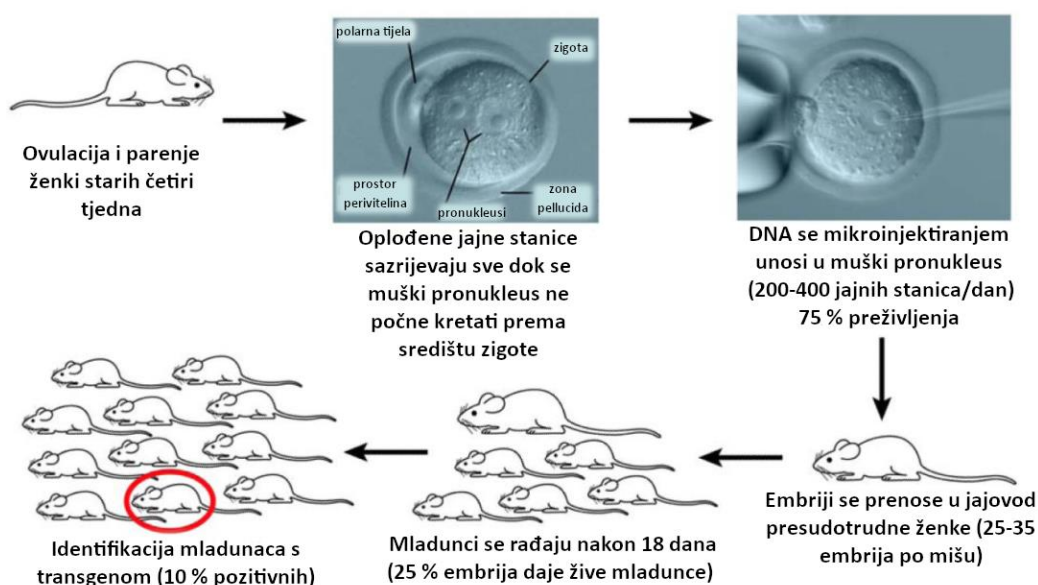
1.2. Metode dobivanja transgeničnih miševa

1.2.1. Mikroinjektiranje u pronukleus

Tehnologija prijenosa gena u genom mikroinjekcijom DNA u pronukleus zigote razvijena je 1980-ih. Mjesto ugradnje transgena u genom je nasumično (Doyle i sur. 2012, Rüllicke i Hübscher 2000). Metoda je omogućila razvoj mnogih modela kao što su mišji modeli arterioskleroze te poremećaja u

metabolizmu lipoproteina. Iako zahtijeva tehničku kompetenciju, metoda je učinkovita i razmjerno laka za izvođenje te je još uvijek u uporabi, unatoč razvoju metoda koje omogućuju ciljanu ugradnju transgena. Ključna prednost mikroinjektiranja u pronukleus je to što ne postoji ograničenje za veličinu konstrukta (Liu 2013). Pronuklearna mikroinjekcija je pogodna za dobivanje transgeničnih životinja različitih vrsta sisavaca, no učinkovitost metode varira ovisno o vrsti (Rülicke i Hübscher 2000).

Dobivanje transgeničnog miša uključuje pripremu DNA za injektiranje, prikupljanje zametaka iz superovulirane donorice, mikroinjektiranje DNA u pronukleus oplođene jajne stanice, prijenos embrija u pseudotrudnu ženku (surogat majku) te identifikaciju životinja nosilaca transgena (DeMayo i sur. 2012). Ovisno o veličini transgenične kazete, svaka oocita se injektira s nekoliko desetaka do tisuća transgena (Rülicke i Hübscher 2000). Pri generiranju jedne transgenične linije koristi se najmanje 200 oplođenih jajnih stanica čime se dobiva dva do četiri transgenika. 75 % zigota je vijabilno nakon injektiranja. Nakon prenošenja u jajovod surogat majki, 25 % embrija će dati žive mladunce, a 10 % potomstva će nositi transgen (**Slika 1**) (DeMayo i sur. 2012).

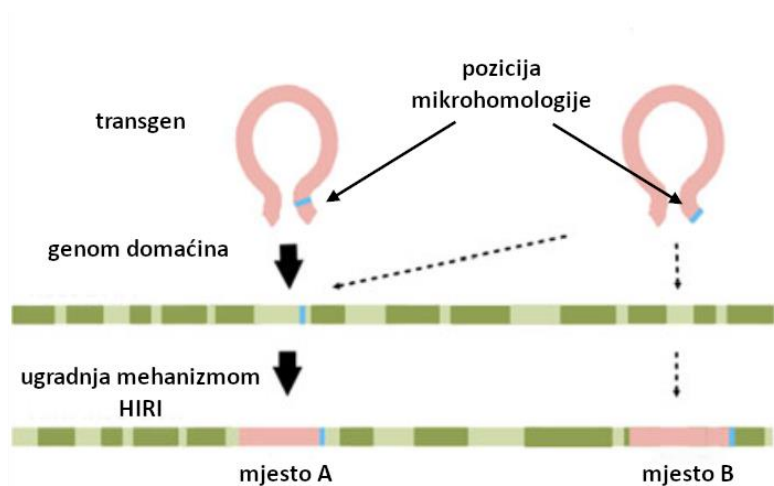


Slika 1. Pregled postupka dobivanja transgeničnih miševa metodom mikroinjektiranja u pronukleus. Ženke stare četiri tjedna su nakon parenja i ovulacije donorice oplođenih jajnih stanica. Kada se muški i ženski pronukleus nalaze u središtu zigote, transgenični konstrukt se unosi mikroinjektiranjem, najčešće u muški pronukleus. Nakon injektiranja, embriji se prenose u jajovod pseudotrudne ženke koja rađa mladunce nakon 18 dana, nakon čega slijedi identifikacija transgeničnih potomaka. Preuzeto i prilagođeno prema Doyle i sur. (2012).

Moguće je injektirati transgen u muški ili ženski pronukleus, no češće se bira muški jer je veći i bolje pozicioniran (Ittner i Götz 2007, Rülicke i Hübscher 2000). Iako je u oociti majčin genom pakiran u kromatin pomoću histona, a očev sadrži protamine, odabir pronukleusa ne utječe uvelike na broj

transgeničnih potomaka (Rülicke i Hübscher 2000). Učinkovitost ugradnje značajno je manja kod injektiranja u citoplazmu. Uz to, učinkovitost postupka ovisi i o liniji miša koja se koristi za dobivanje transgenika te o formi plazmida (lineariziran ili superzavijen) i koncentraciji DNA, dok se veličina fragmenta DNA (od 0,7 do 50 kb) nije pokazala kao značajan parametar (Brinster i sur. 1985).

Budući da se transgen ugrađuje u embrio prije prve diobe, sve će stanice, uključujući izvanembrionalne ovojnice, nositi transgen (Kumar i sur. 2009). Do ugradnje transgena u genom dolazi nakon spontanog loma kromosoma uzrokovanog injektiranjem (Brinster i sur. 1985). Nehomologno spajanje krajeva DNA je pretpostavljeni mehanizam ugradnje transgena. Uz nasumične lomove, DNA topoizomeraza I i enzimi za popravak DNA mogu imati ulogu u ugradnji inserta nehomolognom rekombinacijom (Yan i sur. 2013, Rülicke i Hübscher 2000). Ugradnja nehomolognom rekombinacijom može uzrokovati delecije, duplikacije i translokacije u genomu domaćina. Homologna rekombinacija u endogeni lokus rijedak je ishod (Rülicke i Hübscher 2000). No, kratke homologne sekvence su važno obilježje rekombinacije između nehomolognih sekvenci. Yan i suradnici (2013) su istražujući različite transgenične linije došli do podatka da je oko 76 % ugradnji transgena u genom posredovano mikrohomolognim sekvencama dugima do 19 parova baza. Budući da je ugradnja transgena u genom posredovana mikrohomolognim sekvencama, mehanizam je nazvan homologna ilegitalna nasumična ugradnja (HIRI) (Slika 2).



Slika 2. Ugradnja transgena u genom domaćina odvija se mehanizmom HIRI. Ugradnja mehanizmom HIRI posredovana je mikrohomologijama koje su izvan kraja sekvence transgena te mikrohomologijama u genomu domaćina (mjesto A). Mikrohomologije na samom kraju sekvence transgena mogu posredovati ugradnju u prisutnosti (mjesto A) ili odsutnosti (mjesto B) mikrohomologija u genomu domaćina. Preuzeto i prilagođeno prema Yan i sur. (2013).

Osnivači linije najčešće imaju jedno mjesto ugradnje u genom što znači da je kromosomski lom pri injektiranju rijedak događaj (Brinster i sur. 1985, Haruyama i sur. 2009). Istraživanja mjesta ugradnje transgena kod različitih transgeničnih linija pokazala su da svi kromosomi nisu jednako zastupljeni te da je ugradnja u neke kromosome učestalija (Yan i sur. 2013). Inserti se najčešće ugrađuju u isti lokus

kao tandemska ponavljanja (Brinster i sur. 1985, Haruyama i sur. 2009). Linearne molekule DNA injektiranjem u pronukleus brzo se cirkulariziraju. Nakon cirkularizacije, slijedi nasumična linearizacija i formiranje konkatemera homolognom rekombinacijom ili povezivanjem u tandemska ponavljanja prije ugradnje u genom domaćina (Yan i sur. 2013). Rekombinacija među injektiranim molekulama DNA posljedica je njihove visoke koncentracije, ali i nedostatka kromatinske strukture (Brinster i sur. 1985). Broj ponavljanja gena ugrađenih u jedan lokus može biti i do 100 puta (Rülicke i Hübscher 2000). Kada se više kopija transgena ugradi u isti lokus u tandemskim ponavljanjima, veća je vjerojatnost da će ekspresija transgena biti utišana jer se zbog velikog broja tandemskih ponavljanja stvara struktura kromatina koja je nepovoljna za ekspresiju (Liu 2013, Rülicke i Hübscher 2000).

1.2.1.1. Dizajn transgeničnog konstrukta

Transgenični konstrukt treba sadržavati sve potrebne komponente koje omogućavaju ekspresiju željenog proteina. Uobičajeno, to su promotor i/ili pojačivač koji osiguravaju željeni obrazac ekspresije, gen koji se prepisuje te signal za poliadenilaciju (Liu 2013).

Kako bi se postigla ekspresija karakteristična za stanični tip ili razvojni stadij, ključan je odabir ispravnog promotora. Za većinu gena, nekoliko stotina ili tisuća baza DNA uzvodno mjesta početka transkripcije dovoljno je za postizanje specifične ekspresije (Liu 2013). No, promotor katkad nije dovoljan za postizanje ekspresije transgena. Stoga se dodaju drugi kontrolni elementi, pojačivači, koji mogu na sebe vezati aktivirajuće transkripcijske faktore, s time da i dalje osiguravaju tkivno-specifičnu ekspresiju (Rülicke i Hübscher 2000).

Različiti geni reporteri mogu služiti za karakterizaciju promotora ili obilježavanje odabrane populacije stanica: ekspresija gena reportera odgovara razini aktivnosti ili tkivnoj-specifičnosti promotora. Za kvantitativno određivanje aktivnosti promotora prikladni su luciferaza i kloramfenikol O-acetiltransferaza (CAT) dok su β -galaktozidaza, alkalna fosfataza te fluorescentni proteini prikladniji za izravnu vizualizaciju aktivnosti promotora u stanicama ili tkivima (Liu 2013). Najčešće se koristi cDNA sekvenca odabranih gena reportera. Sekvenca Kozak se u pravilu inkorporira oko start kodona (npr. GCCGCC (G/A) NN ATG G) (Haruyama i sur. 2009).

Intron može poboljšati ekspresiju transgena kroz više mehanizama. Koriste se autentični introni koji su dio genomske sekvence gena koji želimo eksprimirati, ili generički koji su dio genomske sekvence nekog drugog gena. Autentični introni mogu sadržavati *cis*-regulatorne elemente, a generički introni mogu služiti za uvođenje donorskog i akceptorskog mjesta za prekrajanje mRNA. Takav dizajn omogućuje uspješniju ekspresiju transgena jer utječe na stabilnost mRNA te njezinu translokaciju u citoplazmu. Uz to, prisutnost introna može imati utjecaj na strukturu kromatina (Rülicke i Hübscher 2000, Haruyama i sur. 2009). Iz navedenih se razloga genomska DNA često uspješnije eksprimira u

odnosu na cDNA (Liu 2013). Intron zečjeg β -globina te intron virusa SV40 su najčešće korišteni generički introni, a od autentičnih introna se koristi prvi intron koji je smješten uzvodno drugog eksona (Haruyama i sur. 2009).

Eukariotski signal za završetak transkripcije je poli(A) sekvenca (AAAUAA) praćena s još nekoliko stotina nukleotida nizvodno (Haruyama i sur. 2009). Najčešći su u uporabi signali za poliadenilaciju virusa SV40, gena za hormon rasta te β -globina (Haruyama i sur. 2009, Liu 2013).

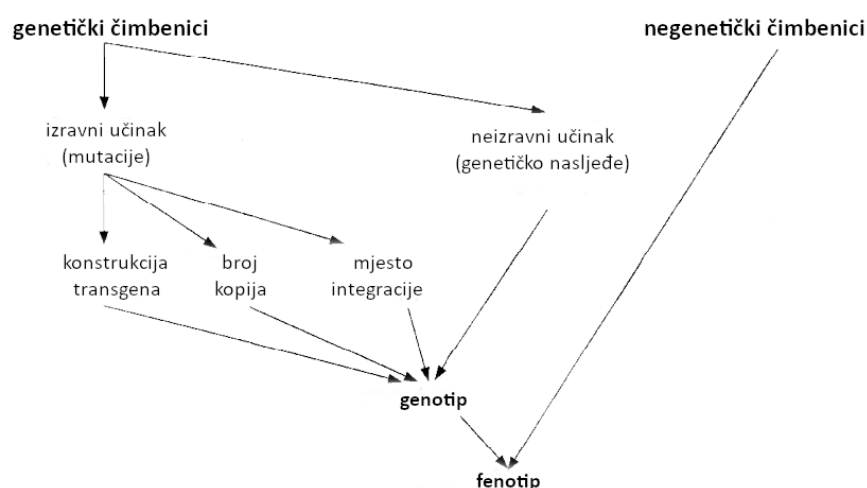
Pozicijski učinak je pojava različite razine ekspresije transgena ovisno o mjestu ugradnje transgena u genom. Uzrokuju ga kromatinsko stanje i regulatorni elementi koji okružuju mjesto ugradnje. Ideja dodavanja tzv. graničnih elemenata u dizajn razvila se kako bi se eliminirao pozicijski učinak, koji se ne može predvidjeti u slučaju nasumične ugradnje transgena u genom. Transgen se može okružiti sekvencama pod nazivom dominantne kontrolne regije (DCRs, od engl. *dominant control regions*) ili kontrolne regije za lokus (LCRs, od engl. *locus control regions*). LCRs su kratke sekvence DNA koje karakteriziraju mjesta osjetljiva na cijepanje DNazom I. LCRs pojačavaju ekspresiju gena te imaju izolatorska svojstva. Omogućavaju održavanje otvorene strukture kromatina te ekspresiju gena čak i nakon ugradnje transgena u područje heterokromatina. LCRs su nađene uzvodno od gena čovjeka za β -globin te nizvodno od gena CD2 (Liu 2013, Rülcke i Hübscher 2000). No, uporaba LCR elemenata je ograničena jer je njihov učinak tkivno-specifičan (Recillas-Targa i sur. 2004). Regije MARs/SARs (od engl. *matrix attachment regions/scaffold attachment regions*) su također pokazale pozitivan učinak na ekspresiju transgena u mišjem genomu: ekspresija je bila neovisna o poziciji u genomu, ali ovisna o broju kopija transgena. No, učinak regija MARs/SARs ovisi o kooperativnosti s drugim regulatornim elementima (Liu 2013, Rülcke i Hübscher 2000). Uz navedene kromatinske regije, ispitan je učinak izolatora, poput izolatora cHS4 koji blokira učinak pojačivača, na ekspresiju gena. No, ako transgenična kazeta nosi jaki promotor, učinak izolatora neće dodatno poboljšati ekspresiju transgena mehanizmom blokade učinka pojačivača. Uz to, izolatori mogu služiti i kao barijera heterokromatinizaciji. Učinak izolatora varira u različitim staničnim tipovima te u stadijima diferencijacije (Recillas-Targa i sur. 2004). Zbog opisanih ograničenja, granični elementi još nisu u raširenoj uporabi (Liu 2013, Rülcke i Hübscher 2000).

Uz navedeno, u konačnom konstruktu potrebno je imati jedinstvena restriksijska mjesta koja će omogućiti izrezivanje transgenične kazete iz konstrukta. Prokariotske sekvence su nepoželjne u transgeničnoj kazeti jer smanjuju vjerojatnost ekspresije transgena nakon ugradnje u genom kroz interferenciju s aktivnošću promotora. No, do 100 dodatnih parova baza obično nema utjecaj na ekspresiju transgena (Haruyama i sur. 2009, Liu 2013). Pri ugradnji transgena može doći do delecije

nekoliko parova baza na krajevima fragmenta DNA te je stoga potrebno voditi računa da restrikcijski enzimi kojima se izrezuje transgenična kazeta ostave nekoliko parova baza izvan kazete (Liu 2013).

1.2.1.2. Regulacija ekspresije transgena

Na fenotip osnivača utjecat će genetički kao i negenetički čimbenici te će različiti osnivači transgenične linije pokazivati različite obrasce ekspresije transgena (**Slika 3**). Uz genom početne linije koja će se genetički preinačiti, genotip transgenične životinje će oblikovati mjesto ugradnje, broj kopija te dizajn transgena. Negenetički čimbenici koji utječu na fenotip transgenične životinje su primjerice uvjeti uzgoja životinja te njihov mikrobiološki okoliš (Rülicke i Hübscher 2000). U nastavku su detaljnije razmotreni genetički čimbenici s izravnim učinkom.



Slika 3. Fenotip transgeničnog miša oblikuju genetički i negenetički čimbenici. Genetičke čimbenike osim genetičkog nasljeđa čine dizajn konstrukta, odnosno nekodirajuće i kodirajuće sekvence koje su dio transgenične kazete. Zatim, bitno je u kojem broju kopija će se transgen ugraditi u genom te na koje mjesto u genomu će se ugraditi. Preuzeto i prilagođeno prema Rülicke i Hübscher (2000).

Unatoč ispravnom dizajnu i provjeri konstrukta *in vitro*, moguće je da ekspresija transgena u mišu nije u skladu s očekivanjem. Česti je slučaj da se transgen slabo eksprimira ili da se uopće ne eksprimira. Druga mogućnost je da obrazac ekspresije ne odgovara očekivanom. Aktivnost promotora u transgenu ovisi o lokalnom genomskom okolišu, ali i o udaljenim pojačivačima i represorima ekspresije (Liu 2013). Pozicijski učinak posebno je izražen kod transgena koji uz promotor ne nose dodatne regulatorne sekvence. Uz to što su regulatorne sekvence vezno mjesto RNA polimeraze II i bazalnih transkripcijskih faktora, one mogu sprječavati represivni učinak strukture kromatina (Liu 2013, Rülicke i Hübscher 2000). Također, dvije kopije transgena u odvojenim lokusima u genomu mogu djelovati represivno

jedna na drugu mehanizmom kosupresije. Transkripcijska represija je posredovana metilacijom DNA i promjenom strukture kromatina, ali i post-transkripcijskim utišavanjem preko razgradnje transkripata (Rülicke i Hübscher 2000).

1.2.1.3. Nasljeđivanje transgena i uspostavljanje stabilne transgenične linije

Transgen se obično nasljeđuje po Mendelovim zakonima. Oko polovice broja potomaka osnivača bi trebalo naslijediti transgen u slučaju ugradnje u jedan lokus. Neočekivani broj potomaka s transgenom može ukazivati na više mjesta ugradnje transgena u genom ili na mozaičnost osnivača do koje dolazi nakon ugradnje transgena u višestanični embrij. Ugradnje u spolne kromosome rezultiraju neočekivanim omjerima potomaka s transgenom i bez njega. Ugradnjom u kromosom Y, transgen će se prenositi samo na muško potomstvo, a zbog velikog broja ponavljajućih sekvenci i regija heterokromatina u kromosomu Y, ne može se očekivati optimalna ekspresija transgena. Kromosom X je pak podložan nasumičnoj inaktivaciji u somatskim staničnim linijama zbog čega hemizigotni ženski embriji imaju mozaični obrazac ekspresije transgena. Ako se transgen ugradi u kromosom X muškog osnivača, samo će njegovi ženski potomci naslijediti transgen. Štetni učinci produkta transgena na mišji organizam također mijenjaju njegov obrazac nasljeđivanja (Rülicke i Hübscher 2000, Haruyama i sur. 2009).

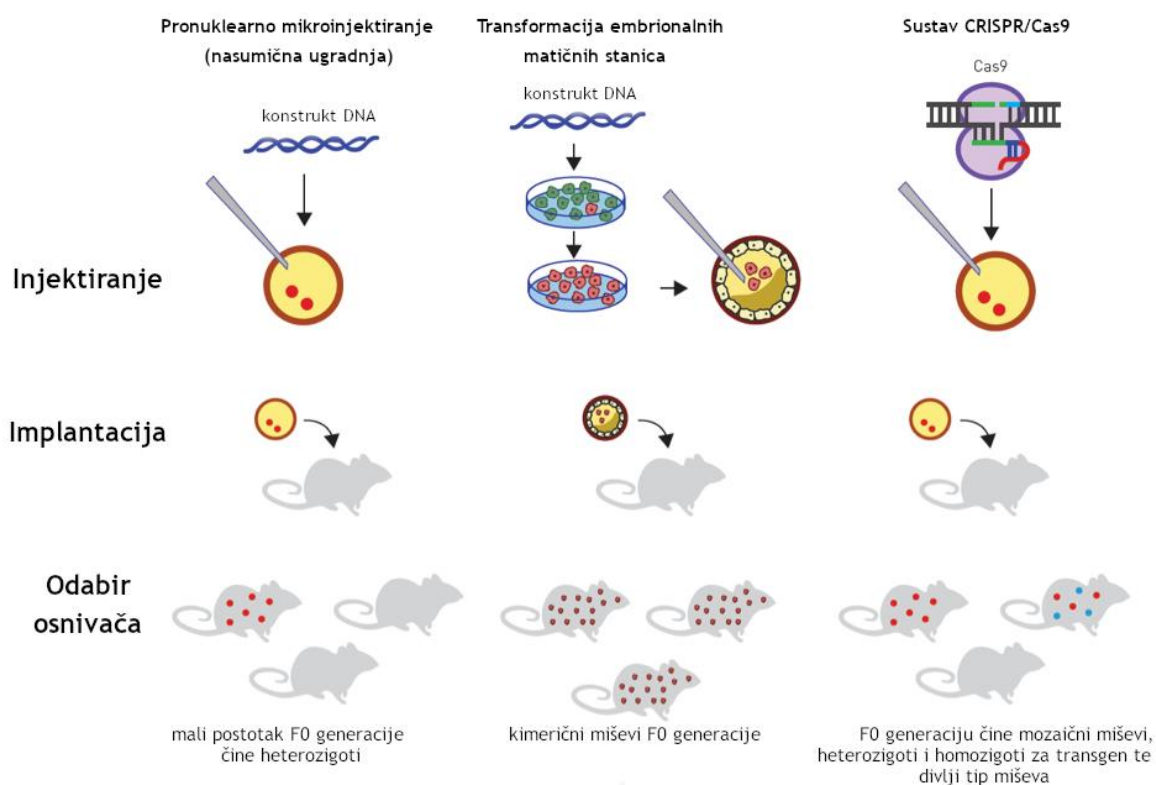
Ekspresija transgena može isprva biti ispravna i robusna, no smanjivati se kroz generacije. Razlog tome mogu biti epigenetičke mutacije poput metilacije DNA ili acetilacije histona koje igraju značajnu ulogu u regulaciji ekspresije transgena. Stoga je bitno osim inicijalne karakterizacije ekspresije transgena dugoročno pratiti njegovu ekspresiju (Liu 2013). U manjem broju genetičkih linija prepoznata je prisutnost genomskog imprintinga koji dovodi do funkcionalnih razlika ovisno o tome je li transgen naslijeđen s očevog ili majčinog genoma (Rülicke i Hübscher 2000).

1.2.2. Druge metode dobivanja transgeničnih miševa

Uz pronuklearno mikroinjektiranje, opisano je uvođenje transgena nasumičnom ugradnjom nakon transfekcije embrija rekombinantnim retrovirusima (Doyle i sur. 2012, Rülicke i Hübscher 2000). Iako je ova metoda omogućavala ugradnju jedne kopije transgena u genom, zbog tehničkih ograničenja nije u rutinskoj primjeni (Tasic i sur. 2011, Kumar i sur. 2009). Uz to, retrovirusni vektori mogu služiti za prijenos transgena velikog do 8 kb te su virusne sekvence koje se ugrade u genom često podložne epigenetičkom utišavanju čime se suprimira ekspresija transgena (Rülicke i Hübscher 2000, Doyle i sur. 2012). Vektori bazirani na lentivirusima zaobilaze neke od problema koje postoje kod vektora na bazi drugih retrovirusa te su moguća alternativa za ugradnju transgena u mišje linije koje je teško izmijeniti pronuklearnim mikroinjektiranjem (Doyle i sur. 2012).

Treća metoda uključuje manipulaciju embrionalnim matičnim stanicama koje se transfeciraju transgenom te injektiraju u blastocistu (**Slika 4**). Ova metoda je korisna kod ugradnje niskog broj kopija transgena u genom te kada je ugradnja letalna za embrij. Kao rezultat nastaju kimerični miševi čije je daljnje sparivanje s divljim tipom potrebno za uspostavu transgenične linije (Haruyama i sur. 2009).

Pronuklearnim injektiranjem može se postići specifičnija ugradnja transgena, uz uporabu dodatnih metoda genetičkog inženjerstva. Ugradnju posredovanu rekombinacijom je moguće postići transpozonima kao što su *Sleeping Beauty* i *PiggyBac* (Doyle i sur. 2012). *Sleeping Beauty* se ugrađuje u TA, a *PiggyBac* u TTAA sekvence. Navedenim sustavima se može se postići ugradnja transgena u jednoj kopiji. Uz to, *Sleeping Beauty* se rjeđe ugrađuje u gene u odnosu na vektore na bazi virusa HIV ili adenovirusa te nudi mogućnost ugradnje većeg transgena (Izsvák i Ivics 2004, Woodard i Wilson 2014, Doyle i sur. 2012). No, transpozoni i dalje mogu posredovati ugradnju kroz cijeli genom te će transgen ugrađen u različita mjesta u genomu biti podložan lokalnom kromatinskom okruženju (Tasic i sur. 2011).



Slika 4. Usporedba metoda dobivanja transgeničnih miševa. Pronuklearnim mikroinjektiranjem dolazi do nasumične ugradnje transgena u genom te se dobiva mali broj životinja koji su heterozigoti za transgen. U embrionalne matične stanice se transgen unosi transformacijom izoliranih stanica. Stanice se zatim prenose u blastocistu. Ako je ugradnja konstrukta bila mjesno-specifična, svi miševi F0 generacije su kimerični. Sustav CRISPR/Cas9 se primjenjuje mikroinjektiranjem plazmida koji eksprimiraju protein Cas9 i gRNA u zigoti. F0 generaciju čine mozaični miševi, heterozigoti i homozigoti za transgen te divlji tip miša. Preuzeto i prilagođeno prema Hagan (2017) te Liu i sur. (2011).

Sustavi za mjesno-specifičnu rekombinaciju kao što su sustavi Cre-loxP i FLP-FRT omogućili su ciljanu ugradnju transgena. Cre i FLP su mjesno-specifične rekombinaze koje prepoznaju loxP odnosno FRT sekvence duge od 25 do 50 parova baza. Ovisno o orijentaciji i lokaciji dva loxP ili FRT mjesta, aktivnost pripadajućih mjesno-specifičnih rekombinaza rezultira delecijama, insercijama ili translokacijama (Doyle i sur. 2011, Liu 2013). Mjesno-specifičnu rekombinaciju moguće je postići i uporabom attB i attP mjesta te integraze ϕ C31 (Tasic i sur. 2011). Najnovije metode koje su u uporabi su endonukleaze ZFN, TALEN te sustav CRISPR/Cas9 (**Slika 4**). Navedene endonukleaze povećale su mogućnost ugradnje transgena u specifični lokus, bez rekombinaza ili embrionalnih matičnih stanica (Doyle i sur. 2011, Liu 2013). Njihovo načelo djelovanja temelji se na homolognoj rekombinaciji, no dvolančani lom se ne inducira nasumično, već je djelovanje endonukleaza navođeno. U slučaju popravka dvolančanog loma vanjskim kalupom, može doći do ugradnje transgena (Gaj i sur. 2013, Shen i sur. 2013).

1.3. Neurofilamenti

Citoskelet neurona čine mikrotubuli, aktinski mikrofilamenti te intermedijarni filamenti. Neurofilamenti su važna komponenta intermedijarnih filamenata neurona (Perrot i sur. 2008). Održavaju stabilnost i promjer aksona te čine najveći dio citoskeleta velikih mijeliniziranih neurona (Lee i Cleveland 1996, Perrot i sur. 2008). Osim strukturnih, neurofilamenti imaju uloge u prenošenju električnih impulsa duž aksona te pridonose dinamičnim svojstvima citoskeleta tijekom diferencijacije, rasta aksona te regeneracije (Yuan i sur. 2012, Perrot i sur. 2008).

Neurofilamenti se formiraju kopolimerizacijom tri proteina molekularnih težina 68 kDa (NFL, od engl. *neurofilament light*), 150 kDa (NFM, od engl. *neurofilament medium*) i 200 kDa (NFH, od engl. *neurofilament heavy*). U miša su neurofilamenti obligatni heteropolimeri. Podjedinica NFL te NFM ili NFH su nužne za formiranje polimera (Zhu i sur. 1997). Stehiometrijski odnos podjedinica NFL, NFM i NFH u neurofilamentima je 4:2:1, no on može varirati ovisno o razvojnoj fazi neurona. Ekspresija tri podjedinice regulirana je na transkripcijskoj i post-transkripcijskoj razini (Perrot i sur. 2008).

Kao i kod ostali intermedijarnih filamenata, ekspresija neurofilamenata specifična je za stanični tip te razvojnu fazu (Charron i sur. 1995). Tijekom inicijalne elongacije neurita ekspresija neurofilamenata nije značajna (Lee i Cleveland 1996). Kada aksoni dosegnu svoje mete, počinje ekspresija podjedinice NFL, a ubrzo se eksprimira i podjedinica NFM. Ipak, u tom stadiju skelet aksona većinom formiraju mikrotubuli (Perrot i sur. 2008). Nakon formiranja sinapsi, počinje mijelinizacija neurona te počinje ekspresija podjedinice NFH, a značajno rastu razine ekspresije podjedinica NFL i NFM. Također, raste promjer aksona. U drugoj fazi, tijekom radijalnog rasta neurona, neurofilamenti postaju najznačajnija komponenta citoskeleta aksona, brojnija od mikrotubula (Lee i Cleveland 1996, Perrot i sur. 2008).

Druge podjedinice neurofilamenata mogu biti nestin, sinemin, sinkoilin i vimentin (Perrot i sur. 2008). Uz navedene, periferin je prisutan u perifernom živčanom sustavu, a α -interneksin u središnjem živčanom sustavu (Yuan i sur. 2012).

1.3.1. Teška podjedinica neurofilamenata

Teška podjedinica neurofilamenata (NFH, od engl. *neurofilament heavy*) je neobavezna komponenta neurofilamenata tijekom prenatalnog razvoja (Shaw i Weber 1982). Kada neuroni aktivno migriraju i stvaraju neurite, NFH je teško detektirati (Lee i Cleveland 1996). Istraživanja neurofilamenata pokazala su da je NFH mogući marker terminalno diferenciranih neurona koji se pojavljuje kasnije u razvoju u odnosu na NFL i NFM (Shaw i Weber 1982). Odvojena regulacija ekspresije podjedinice NFH od podjedinica NFM i NFL je možda u vezi s njihovom genomskom lokacijom (Perrot i sur. 2008). NFH se može naći u tijelu stanice i dendritima, ali poglavito je smješten u aksonima. U *Nefh null* mišu promjer aksona je sačuvan, ali je smanjena brzina prijenosa signala (Yuan i sur. 2012). Uz neurone, NFH je prisutan i u T-limfocitima te embrionalnim srčanim stanicama. Uloga neurofilamenata u neneuralnim stanicama nije razjašnjena (Lee i Cleveland 1996). Mutacije neurofilamenata su jedan od uzroka bolesti čije je obilježje degeneracija motornih neurona. Mutirani aleli gena NFH nađeni su u nekih od pacijenata koji boluju od amiotrofične lateralne skleroze (ALS-a) (Zhu i sur. 1997).

1.4. Optičko snimanje malih laboratorijskih životinja

Geni reporteri mogu se koristiti u svrhu optičkog snimanja malih laboratorijskih životinja. Optičko snimanje omogućava *in vivo* praćenje molekularnih zbivanja zbog čega se ova metoda sve češće primjenjuje. Optička snimanja primjenjuju se u proučavanju infekcija, u onkološkim i toksikološkim istraživanjima, te u vizualizaciji promjena u aktivnosti promotora. Pogodna su isključivo za male laboratorijske životinje, kao što su miševi, čije dubine tkiva nisu velike. Postoje dvije klase reportera za optičko snimanje: fluorescentni i bioluminiscentni (Troy i sur. 2004).

1.4.1. Snimanje fluorescencije

Transegenični miš naziva *Green mouse*, koji je eksprimirao fluorescentni protein GFP, dobiven je 1997. godine. Od tada se fluorescentni proteini rabe za vizualizaciju stanica jedinke (Abe i Fujimori 2013). U animalnom tkivu, hemoglobin i melanin apsorbiraju u vidljivom dijelu spektra, do 600 nm, dok valne duljine dulje od 1100 nm apsorbira voda. Stoga su valne duljine od 650 do 1100 nm pogodne za optičku vizualizaciju procesa u malim laboratorijskim životinjama čime je ograničena uporaba mnogih fluorescentnih proteina. Snimanje fluorescencije *in vivo* napredovalo je kreiranjem proteina koji emitiraju svijetlost u daleko crvenom dijelu spektra, iznad 650 nm (Shcherbo i sur. 2007). Prijašnji transgenični modeli pokazali su kako se fluorescencija daleko crvenih proteina može detektirati na

svježim i fiksiranim uzorcima tkiva (Diéguez-Hurtado i sur. 2011). No, njihova je mana manji intenzitet fluorescencije u odnosu na druge fluorescentne proteine kao što je EGFP (Shcherbo i sur. 2007).

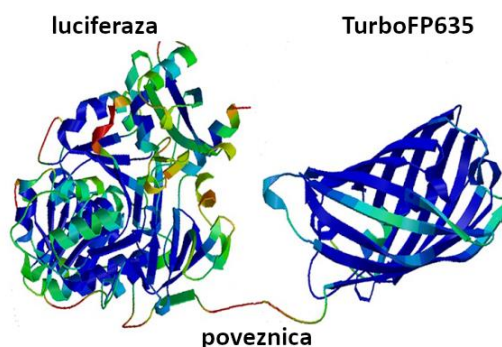
1.4.2. Snimanje bioluminiscencije

Bioluminiscencija je enzimska reakcija proizvodnje svjetlosti u živim organizmima. Luciferaze su enzimi koji kataliziraju oksidaciju supstrata čime se oslobađaju fotoni (Sato i sur. 2004). Iako postoji mnogo različitih luciferaza, samo neke se koriste za snimanje *in vivo*, od kojih je najčešće u uporabi luciferaza krijesnice (FLuc, od engl. *firefly luciferase*). Za razliku od fluorofora, luciferaza ne zahtjeva pobuđivanje svjetlošću, već metabolizira specifičan supstrat (Coleman i McGregor 2015). Različite luciferaze zahtijevaju različite supstrate te specifične uvjete snimanja (Zinn i sur. 2008). Supstrat luciferaze krijesnice je D-luciferin koji prelazi u oksiluciferin uz emisiju svjetlosti valne duljine 562 nm. Ovoj kemijskoj reakciji potrebni su kofaktori ATP, Mg^{2+} te kisik (Sato i sur. 2004, Coleman i McGregor 2015).

Fluorescencija obično daje jači signal od bioluminiscencije, no ovisi o pobuđivanju te obično ima veći pozadinski signal zbog autofluorescencije životinjskih tkiva (Troy i sur. 2004). Prednost bioluminiscencije nad fluorescencijom je niski pozadinski signal, nije potrebna ekscitacija te ne dolazi do oštećenja substaničnih struktura prilikom snimanja (Hara-Miyauchi i sur. 2012). No, mana metode je nužnost ubrizgavanja supstrata (Zinn i sur. 2008).

1.4.3. TurboLuc

TurboLuc je fuzijski protein sastavljen od luciferaze krijesnice (Luc2) i fluorescentnog proteina TurboFP635. Na C-terminalnom kraju se nalazi gen Luc2, a na N-terminalnom je TurboFP635. Između dva proteina je poveznica od 14 aminokiselina (QSTVPRARDPPVAT) (Slika 5). Fuzijski protein, TurboLuc, ima svojstva bioluminiscentnog i fluorescentnog reportera (Mezzanotte i sur. 2014).



Slika 5. Predviđena konfiguracija proteina TurboLuc. Na C-terminalnom kraju se nalazi luciferaza krijesnice, a na N-terminalnom kraju je fluorescentni protein TurboFP635. Između dva proteina je poveznica od 14 aminokiselina.

Luciferaza 2 (Luc2) je sintetska verzija luciferaze krijesnice čiji kodoni su optimizirani za ekspresiju u stanicama sisavaca, a TurboFP635 (Katushka) je fluorescentni protein koji se pobuđuje pri valnoj duljini od 588 nm, a emitira svjetlost valne duljine 635 nm. TurboFP635 brzo sazrijeva, pokazuje pH stabilnost te nije toksičan u stanicama ili životinjama. Dobiven je iz proteina TurboRFP, poboljšane verzije crvenog fluorescentnog proteina eqFP578 iz vrste *Entacmaea quadricolor*. Protein mKate, monomerna je verzija Katushke razvijena za označavanje staničnih proteina (Shcherbo i sur. 2007).

Miš koji bi nosio reporter TurboLuc bio bi izvor označenih stanica (npr. pri izolaciji matičnih stanica). TurboLuc omogućava fluorescentno i bioluminiscentno optičko snimanje *in vivo*. Fluorescentna svojstva proteina TurboLuc su pogodna za vizualizaciju procesa na razini jedne stanice dok je bioluminiscencijom moguće pratiti tijek bioloških procesa (Mezzanotte i sur. 2014).

1.5. Neuralne matične stanice

Neuralne matične stanice (NSCs, engl. *neural stem cells*) su multipotentne matične stanice sa sposobnošću samoobnavljanja te diferencijacije u neurone ili glija stanice (oligodendrocite, astrocite i mikroglija) (Ma i sur. 2015, Fujitani i sur. 2017). Neuroepitelne progenitorne stanice (NEPs) su oblik neuralnih matičnih stanica koji se pojavljuje najranije u razvoju. Heterogena su populacija stanica koja se tijekom embrionalnog razvoja nalazi u neuralnoj ploči te u neuralnoj cijevi. Tijekom sazrijevanja središnjeg živčanog sustava, neuroepitelni progenitori prolaze simetrične diobe čime se stvara populacija neuralnih matičnih stanica. Kasnije asimetričnim diobama nastaju intermedijarni neuralni progenitori koji se diferenciraju u neurone. Po završetku neurogeneze, neuralne matične stanice proizvode progenitore glija stanica koje se diferenciraju u astrocite i oligodendrocite (Kintner 2002). Neuralne matične stanice mogu se izolirati iz mozga u razvoju, ali i iz određenih dijelova odraslog mozga (Kennea i Mehmet 2002).

1.5.1. Terapija neuralnim matičnim stanicama

Budući da neuroni gube proliferacijski potencijal, oštećeno živčano tkivo teško je regenerirati (Fujitani i sur. 2017). Dvije su strategije na kojima se temelji terapija neuralnim matičnim stanicama: stimulacija endogenih populacija kako bi djelovale na mjestu ozljede te transplantacija neuralnih matičnih stanica (Ma i sur. 2015). Nakon transplantacije, neuralne matične stanice mogu migrirati u udaljena područja te se integrirati u moždane strukture (Jandial i sur. 2008). Uz to, neuralne matične stanice pokazuju nisku imunogeničnost i tumorigeničnost (Pickard i sur. 2017). Terapeutski potencijal tehnologije matičnih stanica potaknuo je početkom 1980-ih godina dio istraživača da zaobiđu istraživanja na životinjskim modelima i počnu razvijati terapije na ljudima. Uz to što su se takvi tretmani pokazali neučinkovitim i skupim, nanijeli su štetu mnogim pacijentima (Harding i sur. 2013). Zato se na životinjskim modelima nastavljaju istraživanja transplantacije neuralnih matičnih stanica kao tretmana

za različite defekte i ozljede živčanog sustava. Pozitivni učinci transplantacije pokazali su se nakon oštećenja uzrokovanih ishemičkim ili hemoragičnim moždanim udarom. Transplantirane stanice su izvor neurotrofičnih faktora koji imaju pozitivan učinak na angiogenezu i neurogenezu. Unatoč obećavajućim rezultatima na mišjim modelima te u ranim fazama kliničkih istraživanja, dodatna istraživanja su i dalje potrebna (Tang i sur. 2017). Kako bi se omogućilo stabilno i učinkovito korištenje neuralnih matičnih stanica u terapijske svrhe, potrebno je razviti metode i modele pomoću kojih se može *in vivo* pratiti diferencijacija u određene stanične tipove (Fujitani i sur. 2017).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Opći cilj istraživanja bio je dobivanje nove transgenične linije miševa s bioluminiscentnim i fluorescentnim neuronima. Cilj ovog diplomskog rada bila je konstrukcija i provjera vektora koji nosi transgeničnu kazetu s reporterom TurboLuc pod promotorom NFH. Vektor s transgeničnom kazetom koristi se za dobivanje transgeničnih miševa metodom mikroinjekcije u pronukleus zigote.

Za promotor NFH očekuje se da će omogućiti ekspresiju reportera TurboLuc samo u terminalno diferenciranim neuronima miša. Takav mišji model do sada nije načinjen. Uz to, ne postoje adekvatni mišji modeli koji bi omogućili *in vivo* praćenje diferencijacije neuralnih matičnih stanica nakon transplantacije. Transplantacijom neuralnih matičnih stanica, podrijetlom iz novog transgeničnog miša, u životinju kojoj je određeno područje mozga zahvaćeno ozljedom, bilo bi moguće pratiti *in vivo* dolazi li do diferencijacije neuralnih matičnih stanica u zrele neurone.

Specifični ciljevi ovog istraživanja bili su:

- konstrukcija plazmidnog vektora za propagaciju transgenične kazete
- umnažanje vektora u bakterijama *E. coli* soja *XL10 Gold*
- *in vitro* transfekcija vektora u stanične linije embrionalnog bubrega čovjeka (HEK293), mišjih fibroblasta (L-929) i neuroblastoma čovjeka (SH-SY5Y) u svrhu provjere ekspresije u različitim tipovima stanica
- optimizacija magnetofekcije kulture primarnih neuralnih matičnih stanica miša
- *in vitro* magnetofekcija vektora u primarne neuralne matične stanice miša u svrhu praćenja ekspresije s plazmidnog vektora tijekom njihove diferencijacije
- probir osnivača transgenične linije genotipizacijom mladunaca rođenih nakon mikroinjetiranja transgenične kazete u pronukleuse oplođenih jajnih stanica
- utvrđivanje prisutnosti bioluminiscentnog signala u transgeničnih životinja metodom optičkog snimanja *in vivo*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Komercijalni setovi kemikalija:

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega); EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix (TaKaRa); Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega); QIAfilter Plasmid Midi and Maxi Kit (Qiagen).

Enzimi:

NdeI (10 U/μl; Thermo Fisher Scientific); Sall (10 U/μl; Thermo Fisher Scientific); KpnI (10 U/μl; Thermo Fisher Scientific); SphI (10 U/μl Sigma-Aldrich); KOD Hot Start DNA polimeraza (*KOD Hot Start DNA polymerase*, 1 U/μl; Merck); BsmBI (Esp3I) (10 U/μl; New England Biolabs); Eco31I (BsaI) (10 U/μl; Thermo Fisher Scientific); BsaI (10 U/μl; New England Biolabs); T4 DNA ligaza (*T4 DNA Ligase*, 350 U/μl; TaKaRa); otopina RNaze A (*RNase A Solution*, 4 mg/ml; Promega); proteinaza K (*Proteinase K*, 10 mg/ml; Promega); GoTaq® G2 DNA Polymerase (Promega).

Kultura stanica:

Medij Opti-MEM (*Gibco™ Opti-MEM™*; Thermo Fisher Scientific); medij DMEM (*Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle Medium, low glucose*; Thermo Fisher Scientific); medij DMEM (*Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose*; Thermo Fisher Scientific); fetalni goveđi serum (*Gibco™ fetal Bovine Serum*; Thermo Fisher Scientific); otopina penicilina i streptomicina (*Gibco™ Antibiotic-Antimycotic* (100×); Thermo Fisher Scientific); neesencijalne aminokiseline (*MEM Non-essential Amino Acid Solution* (100×); Sigma-Aldrich); medij DMEM/F-12 (*Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*; Thermo Fisher Scientific); suplement N-2 (*Gibco™ N-2 Supplement* 100×; Thermo Fisher Scientific); suplement B-27 (*Gibco™ B-27™ Supplement* 50×; Thermo Fisher Scientific); bFGF (*Gibco™ Recombinant Human FGF-Basic*; Thermo Fisher Scientific), EGF (*Gibco™ Recombinant Human EGF*; Thermo Fisher Scientific); otopina tripsin-EDTA 0,25 % (*Trypsin-EDTA solution*; Sigma-Aldrich); otopina L-glutamina (*Gibco™ L-Glutamine (200 mM)*; Thermo Fisher Scientific); otopina poli-D-lizina (*Poly-D-Lysine solution*, 1,0 mg/ml; Sigma-Aldrich); laminin (*Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane*; Sigma-Aldrich); akutaza (*Gibco™ StemPro™ Accutase™ Cell Dissociation Reagent*; Thermo Fisher Scientific).

Ostalo:

Pufer Tango (*Tango Buffer* (10×); Thermo Fisher Scientific); Luria-Bertani medij (LB) (Carl Roth); ampicilin (Sigma-Aldrich); agaroz (Sigma-Aldrich); pufer TAE (1 mM Tris, 1 mM octena kiselina, 1 mM EDTA pH 8,0); pufer TBE (Tris, octena kiselina, 0,5 mM EDTA pH 8,0); pufer za lizu (50 mM Tris pH 8,0, 100 mM EDTA pH 8,0, NaCl 100 mM, 1 % SDS); 50 % glicerol; izopropanol; 70 % etanol; *GeneJuice*® *Transfection Reagent* (Merck); *NeuroMag* (OZ Biosciences); mješavina nukleotida (*PCR Nucleotide Mix*, 10mM each; Promega); otopina MgCl₂ (25mM MgCl₂ Solution; Promega); 1×PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,4); D-luciferin (*Pierce™ D-Luciferin, Monosodium Salt*; Thermo Fisher Scientific); izofluran (*Isoflurane*®; Abbott).

Boje i markeri molekulskih masa:

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); *Blue/Orange Loading Dye, 6×* (Promega); *Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder* (New England Biolabs); *BenchTop 100bp DNA Ladder* (Promega); otopina tripanskog modrila (*Gibco™ Trypan Blue Solution*, 0,4 %; Thermo Fisher Scientific); *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium).

Bakterijski soj:

E. coli XL10 Gold

Stanične linije:

L-929 (mišji fibroblasti)

HEK293 (stanična linija embrionalnog bubrega čovjeka, od engl. *human embryonic kidney*)

SH-SY5Y (stanična linija neuroblastoma čovjeka)

Mišja linija:

C57BL/6J

3.2. Metode

3.2.1. Provjera početnih plazmida restrikcijskom digestijom

Plazmidi koji sadrže reporter TurboLuc te promotor NFH ustupljeni su iz laboratorija L. Mezzanotte i J. P. Julien. Prije kloniranja, sekvence ustupljenih plazmida provjerene su restrikcijom. Plazmid pLuc2Turbo635N je pocijepan enzimima NdeI i Sall, a plazmid pNFH je pocijepan enzimima Sall i KpnI.

Reakcijska smjesa digestije plazmida pLuc2Turbo635N sadržavala je 1 µg DNA (0,05 µg/µl), 2×pufer Tango, 10 U enzima NdeI te 10 U enzima Sall. Smjesa inkubirana je 1 h na 37 °C nakon čega su enzimi toplinski inaktivirani na 65 °C tijekom 20 minuta.

Reakcijska smjesa digestije plazmida pNFH sadržavala je 1 µg DNA (0,05 µg/µl), 1×pufer Tango te 40 U enzima KpnI. Smjesa je inkubirana 1 h na 37 °C, nakon čega je dodano 20 U enzima Sall te je koncentracija pufera Tango dvostruko povećana. Reakcijska smjesa je dodatno inkubirana 1 h na 37 °C nakon čega su enzimi toplinski inaktivirani na 80 °C tijekom 20 minuta.

Veličine nastalih fragmenata su određene elektroforezom u 1 %-tnom gelu agaroze, u puferu TAE.

3.2.2. Konstrukcija plazmida s transgeničnom kazetom

Plazmid je konstruiran iz komponenata umnoženih lančanom reakcijom polimerazom ili cijepanjem drugih plazmida restrikcijskim endonukleazama i pročišćavanjem komponenata iz gela agaroze. Uz promotor NFH te reporter TurboLuc, dizajn transgenične kazete uključivao je i pojačivač (engl. *enhancer*), intron zečjeg β-globina te poli(A) signal goveđeg hormona rasta (**Slika 6**).

3.2.2.1. Umnažanje komponenata plazmida lančanom reakcijom polimerazom

Komponente plazmida su umnožene lančanom reakcijom polimerazom (PCR, od engl. *polymerase chain reaction*) iz tri početna plazmida pri čemu su u amplikone uvedena restrikcijska mjesta. Cjelovite mape plazmida iz kojih su umnožene komponente nisu poznate, osim mape plazmida pLuc2TurboFP635N (**Prilog 1**) iz koje je umnožen reporter TurboLuc. Dva preostala plazmida nose promotor NFH te intron zečjeg β-globina. PCR smjesa sadržavala je 0,02 U/µl KOD Hot Start DNA polimeraze, 1×pufer (*Buffer for KOD Hot Start DNA Polymerase*), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM mješavinu dNTP-a, 0,3 µM početnice (**Tablica 1**) te 0,25 ng plazmidne DNA. DNA je umnožena u 35 ciklusa, a temperatura vezanja početnica je bila 60 °C. Na navedeni način su u tri zasebne reakcije umnoženi amplikoni s pojačivačem i promotorom, intronom te reporterom.

Nakon umnožavanja, prisutnost amplikona je provjerena elektroforezom u 1,2 %-tnom gelu agaroze, u puferu TAE.

Tablica 1. Početnice za kloniranje. Navedene početnice korištene su u lančanoj reakciji polimerazom za umnožavanje pojedinih komponenti konstrukta iz početnih plazmida. Podcrtana su uvedena restrikcijska mjesta (BsaI/Esp3I), a podebljanim slovima je označena sekvenca pojačivača koji je umetnut ispred sekvence promotora.

Naziv početnice	Naziv amplikona	Sekvenca početnice 5' - 3'	Tm/ °C	Duljina amplikona /pb
Pro-en_NF-H-fw	pojačivač-NFH	TAA GTC TAG <u>AGG TCT CAT</u> GAC TTC CAG CCT GTA CGC GGA AAA CCA AAC CAA GAA CGA GCC G	73	1420
Pro_NF-H_int-re		TAA TCT CGA <u>GGT CTC</u> TTA CCA AGG CAG CAC TGC GGC AGC TC	68	
int-fw	intron	TAA TCT GCA <u>GGT CTC</u> TGG TAG TGA GTT TGG GGA CCC TTG ATT GTT C	64	632
int-re		TAA TCT CGA <u>GGT CTC</u> TAT GGT GGC GGC GTT GCC CAG GAG CTG TAG G	73	
luc2-fw	reporter	TAC TAA GCT <u>TCG TCT CGC</u> CAT GGT TAT GGA AGA TGC CAA AAA CAT TAA GAA GGG CC	66	2444
FP635-re		TAA GTC TCG <u>AGC GTC TCT</u> AGC GTT AGG CGC CGC TGT GCC CCA GTT TGC TAG GCA G	75	

3.2.2.2. Pročišćavanje produkata PCR-a

Za pročišćavanje produkata PCR-a korišten je komercijalni set kemikalija *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up* prema uputama proizvođača. Nakon pročišćavanja, koncentracija i čistoća DNA određena je spektrofotometrijski.

3.2.2.3. Restrikcija produkata PCR-a

Produkt PCR-a s pojačivačem i promotorom NFH i produkt PCR-a s intronom pocijepani su enzimom Eco31I (izoshizomer BsaI), a produkt s reporterom TurboLuc pocijepan je enzimom BsmBI (izoshizomer Esp3I). Svaka reakcija je sadržavala 1 µg DNA (0,05 µg/µl), enzimu pripadajući pufer te 10 U enzima. Reakcijske smjese inkubirane su 3 h pri odgovarajućim temperaturama (37 °C za enzim Eco31I i 55 °C za enzim BsmBI) nakon čega je enzim toplinski inaktiviran na odgovarajućoj temperaturi (na 80 °C za enzim Eco31I i na 65 °C za enzim BsmBI), 20 minuta.

Nakon restrikcije, veličine produkata ponovno su provjerene elektroforezom u gelu agaroze.

Okosnica vektora i poli(A) signal su cijepani enzimom BsaI te izolirani iz gela agaroze. Mape plazmida pBB-Cl i tNS-pTer-H koji su cijepani su u **Prilozima 2 i 3**.

3.2.2.4. Ligacija

Ligacijska smjesa je sadržavala okosnicu vektora (50 ng) i inserte u omjeru 3:1. Ukupni volumen reakcijske smjese bio je 20 µl, a koncentracija T4 ligaze u reakcijskoj smjesi iznosila je 17,5 U/µl. Reakcijska smjesa je inkubirana 1 h na 16 °C.

3.2.2.5. Transformacija kemijski kompetentnih bakterijskih stanica metodom temperaturnog šoka

Kemijski kompetentne bakterije *E. coli* soja *XL10 Gold* su transformirane s 3 µl ligacijske smjese. Alikvoti bakterija su odmrznuti na ledu (15 min). Nakon odmrzavanja, dodana im je ligacijska smjesa te su inkubirani na ledu dodatnih 15 minuta. Temperaturni šok je izveden prebacivanjem alikvota na 42 °C na 30 sekundi nakon čega je bakterijama dodano 450 µl medija LB sobne temperature. Nakon inkubacije u termostatskoj tresilici 20 minuta na sobnoj temperaturi pri 350 rpm, transformirane bakterije su nasađene na krute LB podloge s ampicilinom u koncentraciji 100 µg/ml. Nasađene bakterije su inkubirane na 37 °C 16 h.

3.2.2.6. Provjera sekvence konstrukta

Sekvenca konstrukta je provjerena metodama PCR na bakterijskim kolonijama, restrikcijskom digestijom te sekvenciranjem DNA. PCR-om je ispitana prisutnost dijelova inserata u konstrukt. Odabrane su tri bakterijske kolonije koje su pokazivale prisutnost amplikona u oba umnažanja PCR-om na bakterijskim kolonijama, izolirana je njihova plazmidna DNA te su sekvence konstrukta određene sekvenciranjem DNA. Restrikcijom je provjerena dužina konstrukta.

3.2.2.6.1. PCR na bakterijskim kolonijama (*colony PCR*)

Kako bi se provjerila prisutnost željenog konstrukta na naraslim bakterijskim kolonijama, specifičnim početnicama umnožene su odabrane komponente konstrukta. Deset kolonija je ispitano početnicama M13F (5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3') i int-re (**Tablica 1**). Reakcijska smjesa je sadržavala 1×*EmeraldAmp GT PCR Master Mix* i 0,2 µM početnice. Kalup (bakterijska kolonija) je dodan uranjanjem sterilnog nastavka za pipetor u reakcijsku smjesu. Kolonije koje su korištene kao kalup su uz to ponovno nasađene na LB ploču s ampicilinom. Uvjeti umnožavanja su bili slijedeći: na 98 °C, 2 minute je trajala početna denaturacija; slijedilo je 30 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije (98 °C, 10 s), prijanjanja početnica (58 °C, 30 s) te elongacije (72 °C, 140 s). Umnožavanje završava završnom elongacijom (72 °C, 60 s).

Pozitivne kolonije su ispitane u dodatnoj lančanoj reakciji polimerazom uz korištenje početnica FP635-fwd (5' TCA AAC CAT GGT GGG TGA GGA TAG CGT G 3') i FP-M13-rev (5' CAG GAG GTA AAA CGA CGG CCA G 3'). Reakcijska smjesa je bila prethodno navedenog sastava, a uvjeti umnožavanja su bili slijedeći: 98 °C, 2 minute je trajala početna denaturacija koju je slijedilo 30 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije (98 °C, 10 s), prijanjanja početnica (60 °C, 30 s) te elongacije (72 °C, 60 s). Umnožavanje završava završnom elongacijom (72 °C, 60 s).

Prisutnost amplikona je provjerena gel elektroforezom u 1 %-tnom gelu agaroze, u puferu TAE.

3.2.2.6.2. Izolacija plazmida za sekvenciranje (*mini prep*)

Prekonočne kulture tri bakterijske kolonije pozitivne u obje PCR reakcije su postavljene u 4 ml medija LB s koncentracijom ampicilina 100 µg/ml na 37 °C pri 350 rpm. Nakon 16 sati inkubacije, plazmidi su izolirani iz 3,5 ml prekonočnih kultura komercijalnim setom kemikalija *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*, prema uputama proizvođača. Nakon izolacije, koncentracija plazmida je određena spektrofotometrijski.

Ostatak prekonočnih kultura je pohranjen na –80 °C uz dodatak glicerola do 25 %, što je bilo pripremljeno miješanjem bakterijske kulture i 50 % glicerola u omjeru 1:1.

3.2.2.6.3. Sekvenciranje konstrukata Sangerovom metodom

Usluga sekvenciranja zatražena je od servisa Macrogen (Nizozemska). Servisu su dostavljeni plazmidi u koncentraciji 100 ng/µl te 10 µM početnice (**Tablica 2**). Uz to, zatraženo je sekvenciranje univerzalnim početnicama M13F (5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3') i M13R-pUC(-40) (5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3').

Tablica 2. Početnice za sekvenciranje. Navedene početnice korištene su za provjeru točnosti sekvence plazmida sekvenciranjem DNA.

Naziv početnice	Sekvenca početnice 5' - 3'	T _m / °C
NF-H_seq1	CTG TGG CAG AAC TTG GCT TC	57
NF-H_seq2	CCT GGA GGT CTG CAC TTG TC	58
int_seq	ATA AAT TCT GGC TGG CGT GG	58
luc_seq1	CCT CAA CGT GCA AAA GAA GC	58
luc_seq2	TCT TCG AGG CTA AGG TGG TG	57

3.2.2.6.4. Restriksijska digestija

Paralelno sa sekvenciranjem, restrikcijom su provjereni izolirani konstrukti. Reakcijska smjesa digestije sadržavala je 1 µg DNA (0,04 µg/µl), 10 U enzima SphI te enzimu pripadajući pufer. Reakcijska smjesa inkubirana je 2 h na 37 °C nakon čega je enzim toplinski inaktiviran na 65 °C tijekom 15 minuta.

Rezultati su određeni gel elektroforezom u 1 %-tnom gelu agaroze, u puferu TAE.

3.2.3. Izolacija konstrukata (*maxi prep*)

Nakon potvrde sekvenciranjem, bakterije s ispravnom sekvencom plazmida ponovno su umnožene, ali u većoj količini. Prekonočna kultura bakterija postavljena je u 100 ml medija LB s koncentracijom

ampicilina 100 µg/ml na 37 °C pri 200 rpm. Nakon 16 sati inkubacije, konstrukt je izoliran iz prekonoćne kulture pomoću komercijalnog seta kemikalija *QIAfilter Plasmid Midi and Maxi Kit* prema uputama proizvođača. U pufer P1 dodana je otopina RNaze A do konačne koncentracije 100 µg/ml.

3.2.4. Održavanje stanica HEK293 i L-929 u staničnoj kulturi

Alikvoti staničnih linija su izvađeni iz tekućeg dušika te su kriotubice sa stanicama uronjene u vodenu kupelj zagrijanu na 37 °C. Stanicama je zatim dodano 10 ml hranjivog medija DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium* s 1 g/ml glukoze) uz dodatak 10 % FBS, 2 mM L-glutamina i 1 % Pen/Strep (otopina antibiotika penicilina (100 U/ml) i streptomicina (100 µg/ml). Nakon centrifugiranja 5 minuta na 200 g na sobnoj temperaturi, supernatant je bačen, a talog stanica je resuspendiran u 2 ml opisanog medija. Stanice su nasađene u bocu T₇₅ (Falcon) s 10 ml medija te uzgajane na 37 °C u atmosferi s 5 % CO₂.

Stanice su presađivane kada bi dostigle 90-100 % konfluencije (svaka dva do tri dana). Pri presađivanju, stanicama je odstranjen medij za rast te su isprane s 5 ml PBS. Zatim su 8 minuta inkubirane u 3 ml 0,25 % tripsina na 37 °C. Djelovanje tripsina je zaustavljeno dodatkom 9 ml medija za rast te su stanice centrifugirane na sobnoj temperaturi, 6 minuta na 450 g. Talog stanica je resuspendiran u 1 ml medija te su stanice nasađene u omjeru 1:4 do 1:8 u 15 ml medija, u bocu T₇₅.

Pri nasađivanju stanica na pločice s 24 bazenčića, broj stanica određen je brojanjem u Neubauerovoj komorici nakon dodatka 0,4 % tripanskog modrila.

3.2.5. Održavanje stanica SH-SY5Y u staničnoj kulturi

Alikvot stanične linije otopljen je kao što je prethodno opisano. Stanični medij za otapanje stanica bio je DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium* s 5 g/ml glukoze) uz dodatak 20 % FBS, 2mM L-glutamina, 1 % otopine neesencijalnih aminokiselina i 1 % Pen/Strep. Pet dana nakon otapanja, stanicama je promijenjen medij te zamijenjen medijem istog sastava, ali uz dodatak 10 % FBS te su nadalje održavane u istom mediju.

Stanice su presađivane svakih sedam dana kada bi postigle konfluentnost od 90 %, a medij im je mijenjan svaka tri do četiri dana. Medij sa suspenzijskom podpopulacijom stanica prebačen je u Falcon tubu dok su adherentne stanice isprane ugrijanim medijem DMEM (s 5 g/ml glukoze), bez dodataka. Adherentna podpopulacija je zatim trispinizirana s 6 ml tripsina te inkubirana 3 minute na 37 °C. Djelovanje tripsina je inhibirano ranije odstranjenim medijem sa suspenzijskim stanicama. Nakon centrifugiranja na sobnoj temperaturi, 6 minuta na 400 g, talog stanica je resuspendiran u mediju DMEM s opisanim dodatcima te su stanice presađivane u omjeru 1:20. Stanice su uzgajane u bocama T₇₅ s 15 ml medija, 37 °C u atmosferi s 5 % CO₂.

3.2.6. Transfekcija staničnih linija HEK293, L-929 i SH-SY5Y

Stanice su nasađene na pločicu s 24 bazenčića 24 h prije transfekcije. Nasađeno je 50 000 stanica L-929 (P14) te SH-SY5Y (P18) po bazenčiću te 30 000 stanica HEK293 (P5) po bazenčiću u 500 µl medija za uzgoj.

Na dan transfekcije stanice su bile 50-75 % konfluentne, u skladu s preporukama proizvođača reagensa za transfekciju (GeneJuice). Stanicama je otklonjen medij te je nadomješten verzijom bez FBS i antibiotika. Stanice su kotransfecirane plazmidima pNFH-TurboLuc i pEGFP-N1 (mapa u **Prilogu 4**). Ukupna količina DNA bila je 0,5 µg ili 1 µg DNA, a omjer plazmida pNFH-TurboLuc i pEGFP-N1 bio je 3:1. Omjer transfekcijskog reagensa GeneJuice i DNA bio je 2:1 za staničnu liniju HEK293, a 3:1 za stanične linije L-929 i SH-SY5Y. Kontrola transfekcije sadržavala je transfekcijski reagens GeneJuice bez plazmidne DNA (tzv. *mock*). Sve reakcije su rađene u duplikatima. Četiri sata nakon transfekcije odstranjena je reakcijska smjesa za transfekciju te zamijenjena odgovarajućim medijem za uzgoj.

Rezultati transfekcije zabilježeni su 24 h, 48 h te 72 h nakon transfekcije na mikroskopu s ugrađenim inkubatorom (EVOS FL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD).

3.2.7. Održavanje primarnih neuralnih matičnih stanica u staničnoj kulturi

Alikvot neuralnih matičnih stanica otopljen je kao što je prethodno opisano. Stanice su prije otapanja izolirane iz telencefalona mišjeg zametka starog 14 dana, presađene jedan put te zamrznute. Medij za rast sadržavao je DMEM:F12 (1:1), 1 % Pen/Strep, 1 % suplement N-2, 2 % suplement B-27, 20 ng/ml bFGF (od engl. *basic fibroblast growth factor*) i 20 ng/ml EGF (od engl. *epidermal growth factor*).

Stanice u kulturi rastu u obliku tzv. neurosfera te su presađivane kada bi neurosfere postigle veličinu od 150 do 200 µm. Talog stanica sakupljao se centrifugiranjem 6 minuta, 400 g pri sobnoj temperaturi. Talog stanica je razbijen s 1 ml akutaze na temperaturi od 37 °C. Stanice su u enzimu inkubirane 10 minuta, a nakon 5 minuta započeta je tituracija taloga (dvaput, u razmaku od 5 minuta talog je resuspendiran pipetiranjem). Djelovanje enzima je zaustavljeno dodatkom medija DMEM:F12 (1:1) nakon čega je talog stanica dobiven ponovnim centrifugiranjem. Stanice su presađivane u omjeru 1:1 ili 1:2. Medij za uzgoj se sastojao od kondicioniranog medija s dodatkom faktora rasta EGF (20 ng/ml) i bFGF (20 ng/ml) te od prethodno opisanog medija za rast, u omjeru 1:3.

3.2.8. Transfekcija primarnih neuralnih matičnih stanica

Neurosfe su dan prije transfekcije nasađene u jednosloj na sterilna stakalca tretirana 10 µg/ml otopinom poli-D-lizina u sterilnoj vodi te 1 mg/ml otopinom laminina u PBS-u. Ukratko, stakalca se ispiru s 400 µl otopine poli-D-lizina. Sljedećeg dana odstranjuje se poli-D-lizin, stakalca se ispiru

sterilnom vodom te se dodaje 400 µl otopine laminina i inkubira na 4 °C, minimalno 1 h. Prije nasađivanja stanica, stakalca se ispiru medijem za rast, bez faktora EGF i bFGF.

Nasađeno je 150 000 primarnih neuralnih matičnih stanica po bazenčiću, na pločici s 24 bazenčića. Pri nasađivanju, mediji za uzgoj neurosfera je zamijenjen medijima slijedećih sastava:

- I) DMEM:F12, 1 % Pen/Strep, 1 % suplement N-2, 2 % suplement B-27
- II) DMEM:F12, 1 % Pen/Strep, 1 % suplement N-2
- III) Kondicionirani medij + 1 % Pen/Strep, 1% suplement N-2, 2 % suplement B-27
- IV) Kondicionirani medij + 1 % Pen/Strep, 1 % suplement N-2

Kondicionirani medij sakupljen je pri presađivanju neurosfera koje su bile u kulturi. Stanice su transfecirane metodom magnetofekcije prema protokolu rada Pickard i sur. (2017, *Basic protocol 2*) jedan dan nakon nasađivanja. Prije transfekcije, medij za uzgoj neurosfera je zamijenjen medijima I do IV, no bez dodatka antibiotika. Plazmidi su razrijeđeni u mediju OptiMEM. Ukupna količina plazmidne DNA po bazenčiću bila je 176 ng. Nakon inkubacije od 5 minuta na sobnoj temperaturi, dodane su magnetne čestice NeuroMag (omjer čestica i DNA bio je 3,5:1) te su transfekcijski kompleksi inkubirani 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon nanošenja transfekcijskih kompleksa na stanice, magnetofekcija je provedena na uređaju *Magnfect Nano II* (nanoTherics Ltd, Newcastle under Lyme, UK) pri frekvenciji od 4 Hz i amplitudi od 0,2 mm, 30 minuta. Za vrijeme magnetofekcije uređaj je bio u inkubatoru na 37 °C, u atmosferi s 5 % CO₂. Nakon 30 minuta, stanicama je promijenjen medij (sastav: I-IV). Kombinacije plazmida u magnetofekciji su bile slijedeće: pNFH-TurboLuc; pNFH-TurboLuc i pEGFP-N1 u omjeru 3:1; pEGFP-N1 i pLuc2TurboFP635N (mape u **Prilozima 4 i 1**) u omjeru 1:1. Svaka kombinacija je ponovljena u četiri različita medija. Kontrole transfekcije su bile plazmidna DNA bez reagensa (engl. *plasmid only*) i *mock*.

Rezultati transfekcije su bilježeni sljedećih 17 dana na mikroskopu s ugrađenim inkubatorom (EVOS FL, Thermo Fisher Scientific), uz mijenjanje medija po potrebi.

3.2.9. Optimizacija transfekcije neuralnih matičnih stanica metodom magnetofekcije

Postupak optimizacije magnetofekcije transfekcijskim reagensom NeuroMag proveden je prema uputama proizvođača: različite količine DNA (0,5, 0,75, 1 i 1,5 µg) korištene su u različitim omjerima s reagensom NeuroMag (1:1, 1:2, 1:3 i 1:3,5). Plazmid korišten u transfekciji bio je pLuc2TurboFP635N (**Prilog 1**).

Nasađeno je 35 000 stanica po bazenčiću pločice s 24 bazenčića 24 h prije transfekcije. Medij za uzgoj neurosfera zamijenjen je medijem istog sastava, ali bez antibiotika Pen/Strep, 2 h prije transfekcije. Ostatak postupka odgovarao je prethodno opisanom.

Rezultati transfekcije su bilježeni 24 h, 48 h i 72 h nakon transfekcije na mikroskopu s ugrađenim inkubatorom (EVOS FL, Thermo Fisher Scientific).

3.2.10. Transfekcija diferenciranih neuralnih matičnih stanica

Neuralne matične stanice ponovno su transfecirane prema protokolu opisanom u poglavlju „Transfekcija neuralnih matičnih stanica“, uz izmjenu količine plazmidne DNA i reagensa NeuroMag, 23 dana nakon početka diferencijacije. Svaki bazenčić je transfeciran s ukupno 1,5 µg plazmidne DNA, a omjer DNA i reagensa NeuroMag bio je 1:3,5. Kontrola je bila *plasmid only* reakcija. Zbog nedostatka neuralnih matičnih stanica u uzgoju, više nije bilo moguće koristiti medije sastava III i IV te su stanice prethodno uzgajane u medijima III i IV, nadalje uzgajane u mediju I, odnosno II.

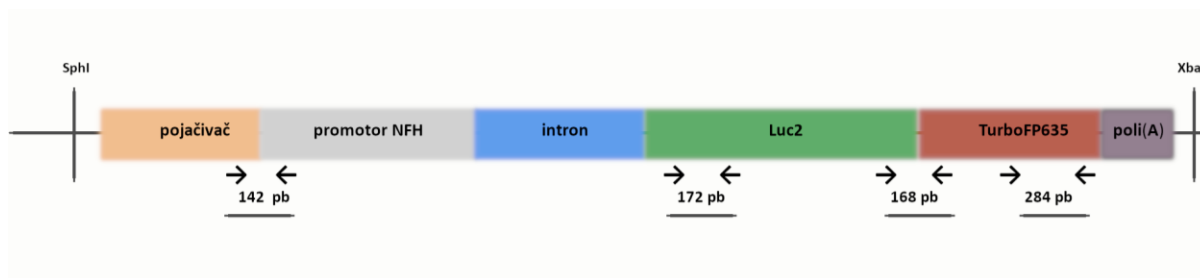
Rezultati transfekcije su bilježeni sljedećih devet dana na mikroskopu s ugrađenim inkubatorom (EVOS FL, Thermo Fisher Scientific), uz mijenjanje medija po potrebi.

3.2.11. Analiza intenziteta fluorescencije

Intenzitet fluorescentnog signala izračunat je u programu ImageJ na fotografijama učinjenima nakon transfekcije neuralnih matičnih stanica. Intenzitet fluorescencije je korigiran s obzirom na pozadinski signal (CTCF, engl. *corrected total cell fluorescence*).

3.2.12. Pronuklearna injekcija

Usluga mikroinjektiranja transgenične kazete u pronukleus zatražena je od komercijalne institucije Norwegian transgenic center (NTS). Usluga je uključivala restrikciju transgenične kazete iz pNFH-TurboLuc plazmida, purifikaciju na gelu agaroze i razrjeđenje transgenične kazete. Za restrikciju su odbrane restrikcijske endonukleaze SphI i XbaI (**Slika 6**). Transgenična kazeta je zatim mikroinjekcijom unesena u 200 jednostaničnih embrija linije C57BL/6J. Embriji su zatim implantirani u pseudotrudne ženke. Nakon rođenja potomaka, pri označavanju mladunaca bušenjem uški (engl. *ear punch*), prikupljen je bioptat komadića uški za genotipizaciju potomaka koji je dostavljen na Hrvatski institut za istraživanje mozga.



Slika 6. Konstrukcija pNFH-TurboLuc. Uzvodno od promotora NFH se nalazi pojačivač. Između promotora i reportera TurboLuc (Luc2 + TurboFP635) nalazi se intron zečjeg β -globina. U nastavku reportera je signal poli(A) goveđeg hormona rasta. Transgenična kazeta izrezana je iz konstrukta restrikcijskim endonukleazama SphI i XbaI. Strelice prikazuju mjesta vezanja početnica za genotipizaciju te dužinu PCR amplikona.

3.2.13. Genotipizacija

Sve dobivene životinje su genotipizirane lančanom reakcijom polimerazom kako bi se prepoznali nosioci transgena.

3.2.13.1 Optimizacija lančane reakcije polimerazom za genotipizaciju osnivača

Izabrane početnice (**Tablica 3**) ispitane su prije genotipizacije osnivača na smjesi genomske DNA te plazmida s transgenom. Izračunat je omjer dužine injektiranog fragmenta i ukupnog genoma miša te je pomiješana genomska DNA i plazmid pNFH-TurboLuc kako bi se dobila količina transgena u slučajevima ugradnje jedne ili deset kopija transgena u genom. Kao negativna kontrola korištena je genomska DNA miša linije C57BL/6J. Uz izabrane početnice, korištene su kontrolne početnice za endogeni lokus na genomu miša (**Tablica 3**). Svaki par početnica za transgen je zasebno ispitivan nakon čega su odabrani uvjeti amplifikacije za svaki par početnica (**Tablica 4**).

Tablica 3. Početnice za genotipizaciju F0 generacije. Četiri para početnica (označene plavom bojom) služe za umnožanje različitih dijelova transgenične kazete (**Slika 6**). Dva para početnica (označene narančastom bojom) vežu se na endogeni lokus u genomskoj DNA miša.

Naziv početnice	Sekvenca početnice 5'-3'	Tm/ °C	Duljina amplikona/ pb
NFH_gen_fwd	ACT GAC TTC CAG CCT GTA CGC	61	142
NFH_gen_rev	AAG TCC ACC GAC CTC CAT CAT G	61	
Luc2_gen_fwd	TGA TCT GCG GCT TTC GGG TC	61	172
Luc2_gen_rev	GCG ATC TCG TGC AAG TTG CTT AG	60	
Luc_FP_gen_fwd	TTC GTG GAC GAG GTG CCT AAA GG	62	168
Luc_FP_gen_rev	GTT CTC GGT GAT CAG CAC GCT ATC	62	
FP_gen_fwd	CAA GAT CAA CGG GGT GAA CTT CC	61	284
FP_gen_rev	GCT GCT CGA CGT AGG TCT CTT TG	62	
E15L5 (fwd)	GGA CAG CAG CCT CCT TAG A	64	389
EC3 (rev)	TCT GCC TGC CTT GTT TCT T	64	
E15H5 (fwd)	ACT GTG GGG AGA CAC AAA GG	63	348
E15H3 (rev)	TCT ACC AGG CCC AGT CAG TC	63	

Tablica 4. Uvjeti amplifikacije pri genotipizaciji osnivača. Svi osnivači su genotipizirani s četiri različita para početnica. Uz početnice za transgenični lokus, u svakoj reakciji je korišten i par početnica koje se vežu za endogeni lokus kako bi se potvrdila uspješnost PCR-a i prisutnost genomske DNA miša u reakcijskoj smjesi.

PCR reakcija / br.	Početnice za transgenični lokus	Početnice za endogeni lokus	Ta / °C	Broj ciklusa
1	NFH_gen_fwd i NFH_gen_rev	E15L5 i EC3	58	30
2	Luc2_gen_fwd i Luc2_gen_rev	E15L5 i EC3	58	30
3	Luc_FP_gen_fwd i Luc_FP_gen_rev	E15H5 i E15H3	61	30
4	FP_gen_fwd i FP_gen_rev	E15H5 i E15H3	61	30

3.2.13.2. Izolacija genomske DNA iz biopsija miševa

Uzorcima je dodano 500 µl pufera za lizu te 10 µl otopine proteinaze K te su inkubirani preko noći na 56 °C. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani 20 minuta na 16 000 g kako bi se istaložili ostatci tkiva te je odvojen supernatant. Supernatantu je dodan jednak volumen izopropanola te je smjesa energično pomiješana pri čemu DNA počinje percipitirati. Nakon centrifugiranja 5 minuta na 16 000 g,

supernatant je bačen, a talog DNA je ispran s 800 µl 70 % etanola. Talog DNA je sušen 90 minuta na 37 °C te otopljen u 150 µl sterilne vode. Otopljena DNA je inkubirana 30 minuta na 90 °C te skladištena na 4 °C prije uporabe u lančanoj reakciji polimerazom.

3.2.13.3. Genotipizacija (lančana reakcija polimerazom i gel elektroforeza PCR produkata na agaroznom gelu)

Izolirana DNA korištena je kao kalup za lančanu reakciju polimeraze. Svaki je uzorak ispitan na četiri kombinacije početnica za endogeni lokus i komponentu transgena (**Tablica 4**). Reakcijska smjesa je sadržavala 0,025 U/µl GoTaq DNA polimeraze, 1×*Green buffer* (konačna koncentracija MgCl₂ od 2,5 mM je postignuta dodatkom 25 mM otopine MgCl₂), 0,2 mM mješavinu dNTP-a, 0,4 µM početnice te približno 100 ng kalupa DNA.

Prisutnost amplikona je provjerena gel elektroforezom u 1,8 %-tnom gelu agaroze, u puferu TBE.

3.2.14. Optičko snimanje biolumiscencije *in vivo*

Bioluminiscencija je snimana na selektiranim osnivačima transgenične linije te na kontrolnom mišu linije C57BL/6J. Transgenični miševi su crnog krzna te im je prije snimanja otklonjena dlaka na području posteriorne strane lubanje. Životinjama je administriran inhalacijski anestetik (2 % izofluran u 100 % kisiku, 1 l/min) u indukcijskoj komori uređaja XGI-8 Gas Anesthesia System (Caliper, Alameda, CA, SAD). Životinje su pod anestezijom smještene u tamnu komoru uređaja IVIS Spectrum (Caliper, Alameda, CA, SAD). Prije i nakon intraperitonealnog injeciranja 150 mg/kg tjelesne težine D-luciferina u PBS-u, životinje su snimljene u tamnoj komori pomoću CCD kamere (iKon, Andor Technologies Ltd., Belfast, UK). Korišteno je vidno polje E (FOV E), a vrijeme ekspozicije je bilo 120 sekundi. Životinje su držane pod anestezijom tijekom cijelog snimanja inhaliranjem 1 % izoflurana.

4. REZULTATI

4.1. Konstruirani plazmid sadrži reporter TurboLuc pod kontrolom promotora NFH

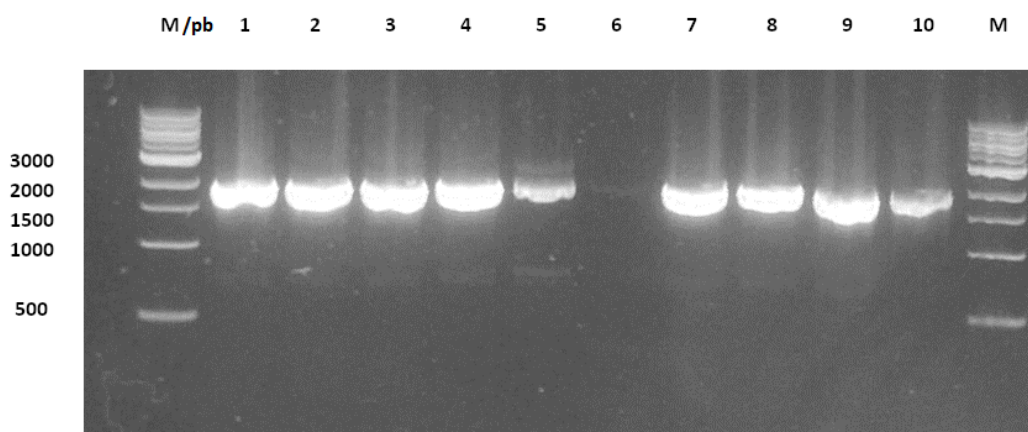
Kako bi se osigurala specifičnost ekspresije reportera TurboLuc za terminalno diferencirane neurone, konstruiran je plazmid u kojem je promotor NFH smješten uzvodno od reportera. Nakon provjere sekvence početnih plazmida pLuc2Turbo635N (**Prilog 1**) i pNFH koje su ustupili laboratoriji L. Mezzanotte i J. P. Julien, sljedilo je umnažanje komponenti konstrukta lančanom reakcijom polimerazom pri čemu se pomoću odabranih početnica uvode restrikcijska mjesta (**Tablica 1**). Restrikcijom produkata PCR-a nastaju ljepljivi krajevi koji se uz pomoć ligaze kloniraju u konačni konstrukt. Uspješnost ligiranja te orijentacija inserata provjeravaju se PCR-om na bakterijskim kolonijama i restrikcijskom digestijom, a prisutnost mutacija provjerava se sekvenciranjem DNA.

PCR-om su uvedena vezna mjesta restrikcijskih endonukleaza tipa IIs koje režu sekvencu DNA izvan mjesta prepoznavanja. Uporabom restrikcijskih endonukleaza tipa IIs pri kloniranju osigurano je dobivanje odabranih stršećih krajeva te slaganje više fragmenta u vektorsku okosnicu u željenom redoslijedu, u jednoj reakciji ligacije. Metoda omogućava istovremeno kloniranje do devet fragmenata u akceptorski vektor. Nastali produkt ne sadrži mjesto prepoznavanja restrikcijske endonukleaze kojom su pocijepani ugrađeni fragmenti (Engler i sur. 2009, Engler i Marillonnet 2011). Na ovaj način je, u konkretnom slučaju, u vektor ugrađeno četiri fragmenta: promotor NFH te prikladni pojačivač, intron zečjeg β -globina, reporter Turboc te poli(A) signal goveđeg hormona rasta.

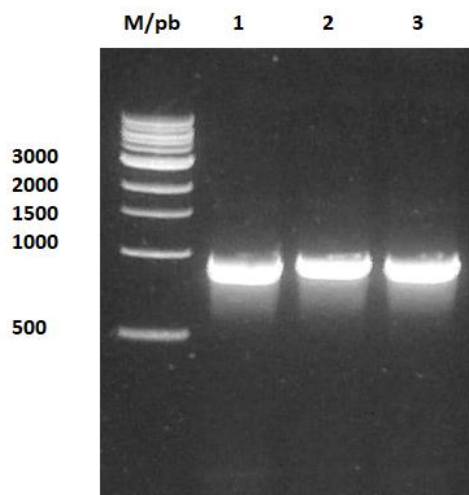
Za mišji promotor teške podjedinice neurofilamenata (NFH) očekuje se da osigura ekspresiju specifičnu za terminalno diferencirane neurone. Korištena sekvenca promotora obuhvaća od -1353 do +10 mišjeg gena *Nefh* u sklopu koje se nalazi sekvenca (-106) GGGGAGGAGG-(15 pb)-CCTCCTCCCC (-72) koja je nužna za postizanje specifičnosti ekspresije (Schwartz i sur. 1994). Ekspresiju reportera specifičnu za neurone treba osiguravati i promotoru pridruženi pojačivač. Sekvenca od 16 pb (5' CTTCAGCCTGTACGC 3') iz promotora tirozin hidroksilaze štakora omogućava stabilnu ekspresiju s promotora NFH te služi kao pojačivač (Zhang i sur. 2011). Intron β -globina te poli(A) signal pridonose stabilnosti transkripata, a sekvenca Kozak mjesto je vezanja ribosoma za transkripte (Haruyama i sur. 2009). Ugradnjom transgenične kazete u vektor omogućava se njena propagacija te daljnje korištenje pri generiranju transgenične linije.

Uvođenje nekoliko fragmenata u okosnicu vektora restrikcijskim endonukleazama tipa IIs ima visoku učinkovitost. Više od 90 % bakterijskih kolonija nosi željeni konstrukt (Engler i Marillonnet 2011). Nakon uvođenja četiri fragmenta u vektorsku okosnicu, uspješnost postupka provjerena je PCR-om na bakterijskim kolonijama, restrikcijom te sekvenciranjem DNA. Prvim PCR-om na bakterijskim kolonijama utvrđeno je da je devet od deset odabranih bakterijskih kolonija pozitivno za fragment koji

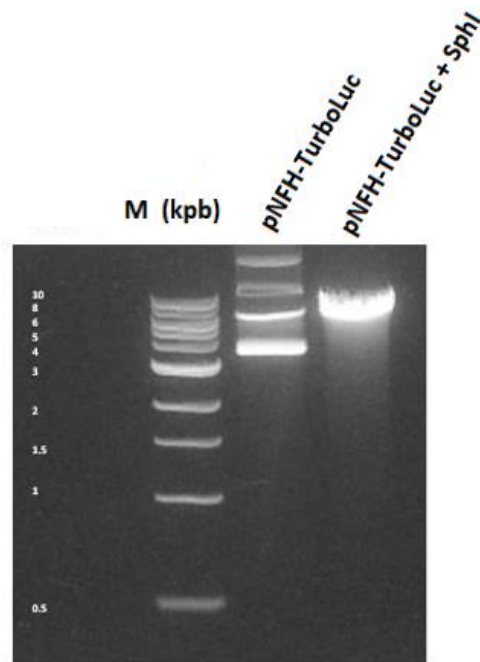
uključuje dijelove pojačivača i promotora NFH te β -globinskog introna (**Slika 7**). Drugim PCR-om je u odabrane tri kolonije potvrđena ugradnja reportera u konstrukt (**Slika 8**). Restrikcijom endonukleazom SphI potvrđena je dužina konstrukta (**Slika 9**). Sekvenciranje DNA pokazalo je kako sekvenca konstrukta u dvije od tri bakterijske kolonije ne sadrži mutacije. Rezultat ovog postupka bio je plazmid u kojem je reporter TurboLuc pod kontrolom promotora NFH (**Slika 10**).



Slika 7. Prvi PCR na bakterijskim kolonijama pokazuje pozitivan rezultat na devet od deset odabranih bakterijskih kolonija. U PCR-u su korištene početnice koje se vežu unutar sekvenci vektorske okosnice te β -globinskog introna te daju ampikon od 2052 pb. Prisutnost ampikona je detektirana u uzorcima 1-5 te 7-10. Marker molekulskih masa (M) je *Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder* (New England Biolabs).



Slika 8. Drugi PCR na bakterijskim kolonijama pokazuje pozitivan rezultat na tri odabrane bakterijske kolonije. U PCR-u su korištene početnice koje se vežu unutar sekvenci reportera TurboLuc te okosnice vektora te daju ampikon od 991 pb. Prisutnost ampikona detektirana je u uzorcima 1-3. Marker molekulskih masa (M) je *Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder* (New England Biolabs).



Slika 9. Restrikcijском digestijom potvrđena je veličina konstruiranog plazmida pNFH-TurboLuc od 6610 pb. Plazmid je lineariziran restrikcijском endonukleazom SphI. Marker molekulskih masa (M) je *Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder* (New England Biolabs).



Slika 10. Mapa plazmida pNFH-TurboLuc koji služi za propagaciju transgenične kazete potvrđena je sekvenciranjem DNA. Komponente plazmida su slijedeće: **DTS**: regija za vezanje transkripcijskih faktora, iz virusa SV40, koja služi za unos plazmida u jezgru, **pojačivač**, **promotor NFH** (od engl. *neurofilament heavy*), **intron β -globina**, **sekvenca Kozak**, **Luc2** (od engl. *luciferase 2*), **TurboFP635**, **bGH poli(A) signal**: terminacijska sekvenca gena goveđeg hormona rasta, **ori** (od engl. *origin of replication*): ishodište replikacije plazmida, **promotor AmpR**, **AmpR**: rezistencija na ampicilin (β -laktamaza).

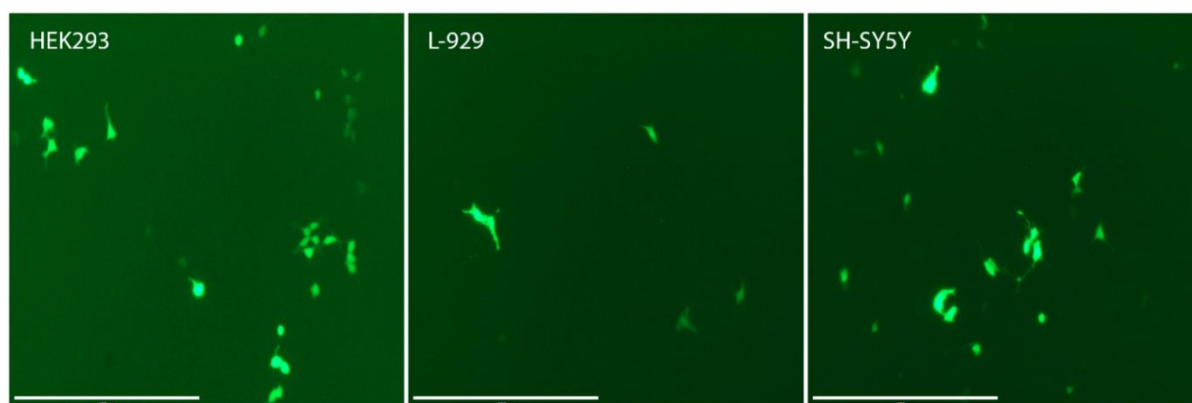
4.2. Fluorescentni signal proteina TurboLuc nije zabilježen nakon transfekcije konstrukta u stanične linije HEK293, L-929 i SH-SY5Y

Nakon što je sekvenciranjem DNA potvrđeno da je dobiven dizajnirani konstrukt, mogućnost stvaranja funkcionalnih reporterskih proteina TurboLuc te stanična specifičnost njihove ekspresije ispitana je u *in vitro* sustavu. Stanične linije HEK293 (dobivena iz embrionalnog bubrega čovjeka), L-929 (mišji fibroblasti) i SH-SY5Y (dobivena iz neuroblastoma čovjeka) su kotransfecirane testnim i kontrolnim plazmidom (pNFH-TurboLuc i pEGFP-N1 (**Prilog 4**)). Navedene stanične linije služile su kao primjer različitih tkiva: HEK293 epitelnog, L-929 vezivnog, a SH-SY5Y živčanog. Ekspresija proteina TurboLuc s konstrukta pNFH-TurboLuc mogla se očekivati u stanicama neuroblastoma, SH-SY5Y.

Fluorescentni signal proteina EGFP eksprimiranog s kontrolnog plazmida pEGFP-N1 zabilježen je 24 h, 48 h te 72 h nakon transfekcije. Ekspresija proteina EGFP s plazmida pEGFP-N1 ukazuje na uspješnu

transfekciju svih navedenih staničnih linija. Protein EGFP je pod kontrolom snažnog promotora citomegalovirusa (CMV) koji osigurava njegovu konstitutivnu ekspresiju (**Slika 11**).

U istim jažicama nije detektiran fluorescentni signal proteina TurboLuc, reportera s plazmida pNFH-TurboLuc (**Slika 11**). Obzirom na negativni rezultat, funkcionalnost načinjenog plazmidnog vektora trebala je biti provjerena u drugom staničnom modelu. Kao takav model uzete su neuralne matične stanice koje *in vitro* diferenciraju u neurone.



Slika 11. Ekspresija fluorescentnog proteina EGFP zabilježena je u staničnim linijama HEK293, L-929 i SH-SY5Y 72 h nakon kotransfekcije. Protein EGFP eksprimiran je s kontrolnog plazmida pEGFP-N1, no ekspresija proteina TurboLuc s plazmida pNFH-TurboLuc nije zabilježena. Bijela crta označava skalu od 400 μ m.

4.3. Optimizacija magnetofekcije reagensom NeuroMag pokazuje kako veća količina DNA i reagensa povećava učinkovitost metode

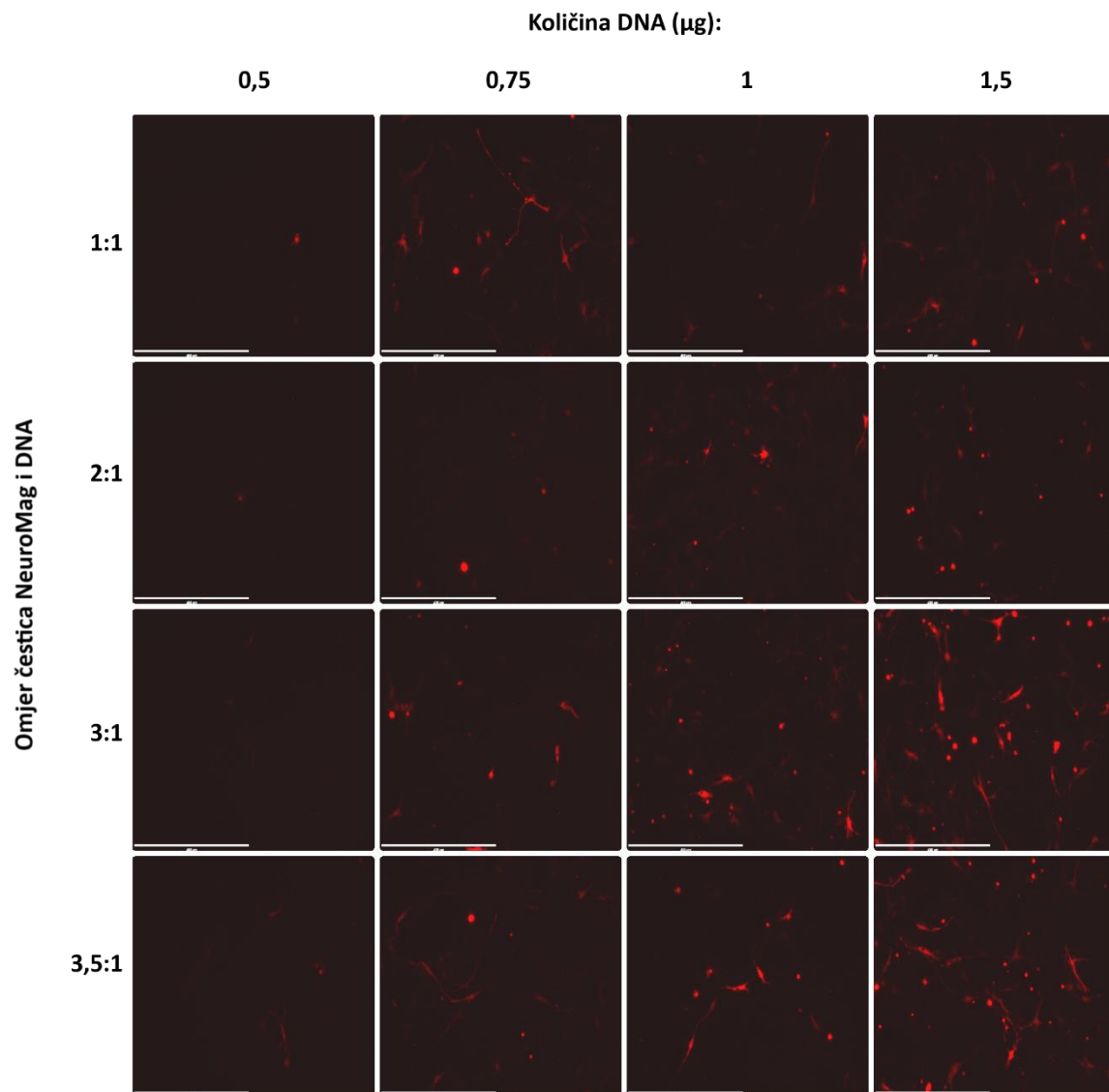
Za uspješnu transfekciju neuralnih matičnih stanica nije moguće koristiti reagens GeneJuice koji je korišten za prethodne transfekcije te je stoga optimizirana metoda magnetofekcije. Magnetofekcija je unosenje multimodalnih magnetnih nanočestica pomoću djelovanja magnetnog polja. Multimodalne magnetne nanočestice su stabilna i sigurna alternativa za virusnu transfekciju te su dizajnirane za različite namjene, kao što su genetske modifikacije ili obilježavanje stanica (Pickard i sur. 2017, Jenkins i sur. 2014). Za optimalnu magnetofekciju, neuralne matične stanice nasađuju se u jednostanični sloj. Za magnetofekciju su korištene čestice NeuroMag koje su razvijene za magnetofekciju neurona, no mogu služiti i za transfekciju neuralnih matičnih stanica (Pickard i sur. 2017).

Kako bi se mogla primijeniti, metoda magnetofekcije je prvo optimizirana na odabranoj staničnoj liniji, neuralnim matičnim stanicama. Metoda je optimizirana s obzirom na parametre količine DNA te omjera magnetnih čestica i DNA. Prije magnetofekcije, stanice su nasađene u jednostanični sloj. Na dan magnetofekcije, promjenom medija potaknuta je diferencijacija neurosfera. Medij za uzgoj je

sadržavao faktore rasta EGF i bFGF, a njihovim uklanjanjem se inducira diferencijacija neuralnih matičnih stanica. Dan nakon transfekcije, zabilježen je fluorescentni signal. Veći broj fluorescentnih stanica zabilježen je 48 h nakon transfekcije. Učinkovitost transfekcije izračunata je na osnovu analize fotografija učinjenim 48 h nakon transfekcije (**Tablica 5, Slika 12**). Izbrojen je broj stanica s fluorescentnim signalom na tri vidna polja te podijeljen s ukupnim brojem stanica u ista tri vidna polja. Učinkovitost transfekcije raste s količinom plazmidne DNA te s većim omjerom reagensa i plazmidne DNA. Međutim, pri prisutnosti 2,25 µg i više magnetnih čestica u jažici, dolazi do odumiranja velikog broja stanica. Najveća učinkovitost transfekcije iznosi 11,4 % te je postignuta u reakciji s 1,5 µg DNA te omjerom reagensa i DNA 3:1. Omjer 3,5:1 dao je sličnu učinkovitost transfekcije. Optimizacija je rađena plazmidom pLuc2TurboFP635N (6323 pb) koji je manji od plazmida pNFH-TurboLuc (6610 pb), no razlika u veličini je minimalna te se slična učinkovitost očekivala i s transfekcijom plazmidom pNFH-TurboLuc. U literaturi maksimalna postignuta učinkovitost transfekcije iznosi oko 30 % što je više nego što je bilo postignuto ovom optimizacijom (Pickard i sur. 2017). Optimizirati bi se mogli i drugi parametri kao što su broj stanica koje se transfeciraju i vrijeme inkubacije transfekcijskih kompleksa.

Tablica 5. Veći omjer magnetnih čestica i DNA te veća količina DNA rezultiraju učinkovitijom transfekcijom. Utjecaj različitih parametara na učinkovitost transfekcije metodom magnetofekcije kulture primarnih neuralnih matičnih stanica ispitan je transfekcijom plazmida pLuc2TurboFP635N reagensom NeuroMag. Stanice su transfecirane različitom količinom plazmidne DNA te različitim omjerom reagensa i plazmidne DNA. Brojevi u tablici predstavljaju postotak uspješno transfeciranih stanica za svaku od kombinacija transfekcijskih parametara.

		količina DNA (µg)			
		0,5	0,75	1	1,5
Omjer čestica NeuroMag i DNA	1:1	0,2 %	2,6 %	3,0 %	4,3 %
	2:1	0,1 %	0,3 %	2,5 %	4,8 %
	3:1	0,2 %	5,0 %	5,9 %	11,4 %
	3,5:1	0,4 %	3,6 %	5,7 %	10,1 %



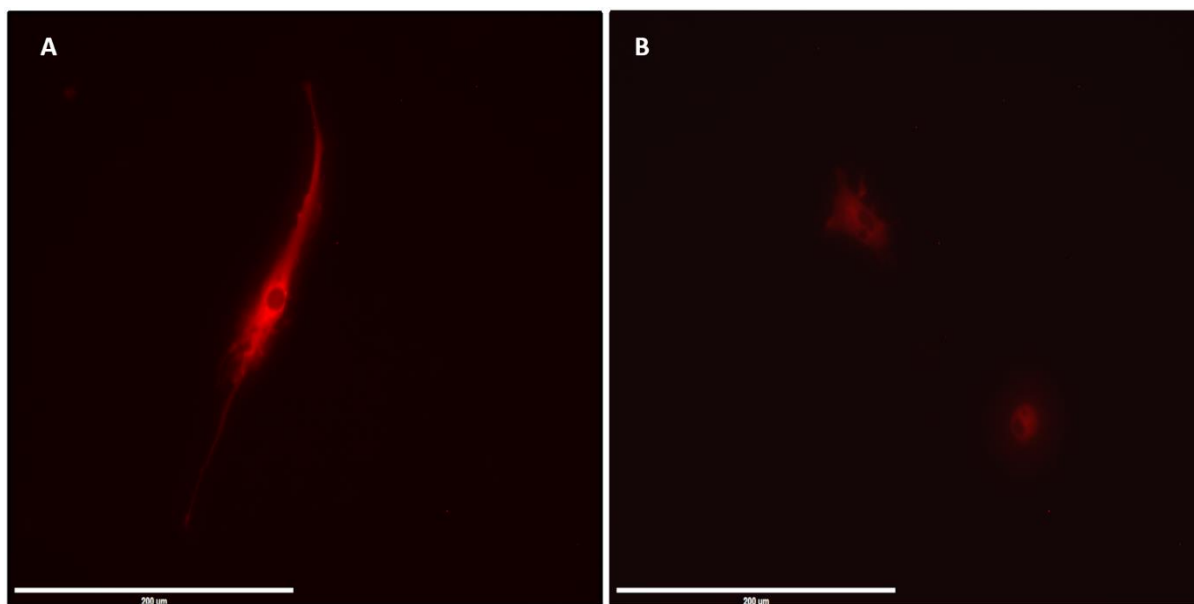
Slika 12. Najveća uspješnost magnetofekcije iznosi oko 10 %. Neurosfere su nasađene u jednostanični sloj te transfecirane plazmidom pLuc2TurboFP635N (6323 pb). Ispitani su različiti omjeri čestica NeuroMag i plazmidne DNA te različite količine plazmidne DNA. Prikazani su podatci iz kojih je kvantifikacijom dobivena **Tablica 5**. Snimljeno 48 h nakon transfekcije. Bijela crta označava skalu od 400 μm.

4.4. Ekspresija proteina TurboLuc s plazmida pNFH-TurboLuc dobivena je u diferenciranim neuralnim matičnim stanicama

Kako bi se potvrdila funkcionalnost i stanična specifičnost ekspresije s plazmida pNFH-TurboLuc, transfecirane su neuralne matične stanice mišjeg podrijetla. Uz transfekciju testnim plazmidom (pNFH-TurboLuc), stanice su također kotransfecirane testnim i kontrolnim plazmidom (pNFH-TurboLuc i pEGFP-N1). Dan prije transfekcije, plutajući agregati stanica (neurosfera) nasađeni su u jednostanični sloj na podlozi s poli-D-lizinom i lamininom. Uz to, diferencijacija stanica je inducirana promjenom medija za uzgoj. Ispitan je učinak četiri različita sastava medija, a razlike među ispitanim medijima su bile u tome je li medij kondicioniran iz kulture neurosfera ili je svježije pripremljen te sadrži li suplement B-27 ili ne. Dan nakon nasađivanja stanica i promjene medija u svrhu induciranja diferencijacije, stanice su transfecirane metodom magnetofekcije. Diferencijacijom neuralnih matičnih stanica dolazi do formiranja populacije terminalno diferenciranih neurona u kojima se očekuje ekspresija proteina TurboLuc s plazmida pNFH-TurboLuc.

Nakon promjene medija pri nasađivanju u jednostanični sloj, stanice su diferencirale što je zapaženo u promjeni njihove morfologije. Uz to, nije uočeno povećanje broja stanica što ukazuje na to da nije dolazilo do dioba stanica. S druge strane, njihov broj se smanjivao zbog odumiranja uslijed diferencijacije stanica te starenja kulture. Stanice uzgajane u kondicioniranom mediju (medij III i medij IV) su pokazivale izraženije morfološke karakteristike neurona, neovisno o dodatku suplementa B-27 (**Slika 13, A**). No, morfologija stanica i aktivnost promotora NFH se nisu preklapale te je ekspresija fluorescentnog proteina TurboLuc zabilježena i u stanicama koje nisu imale dugačke neurite, tipične za diferencirane neurone (**Slika 13, B**).

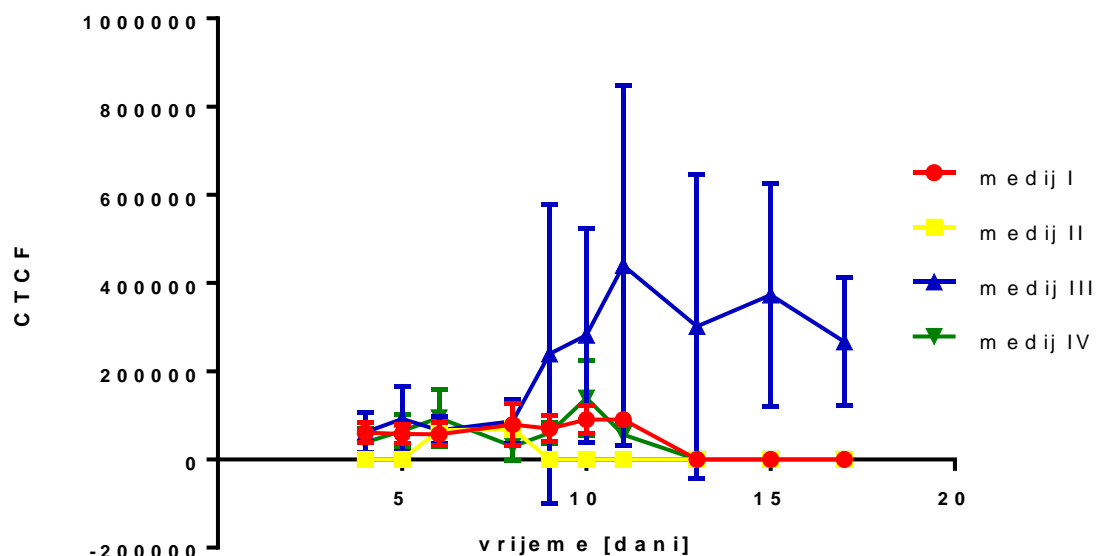
Fluorescentni signal proteina eksprimiranih s plazmida kojima su stanice transfecirane zabilježen je 24 h nakon transfekcije. Za vrijeme pokusa, uz ukupni broj stanica koje eksprimiraju fluorescentne proteine, praćen je i prosječni intenzitet fluorescencije stanica korigiran za pozadinski signal (CTCF, engl. *corrected total cell fluorescence*). CTCF je izračunat iz fotografija stanica snimljenih od četvrtog do 17. dana transfekcije. Broj analiziranih stanica u pojedinim vremenskim točkama varirao je od jedan do 28.



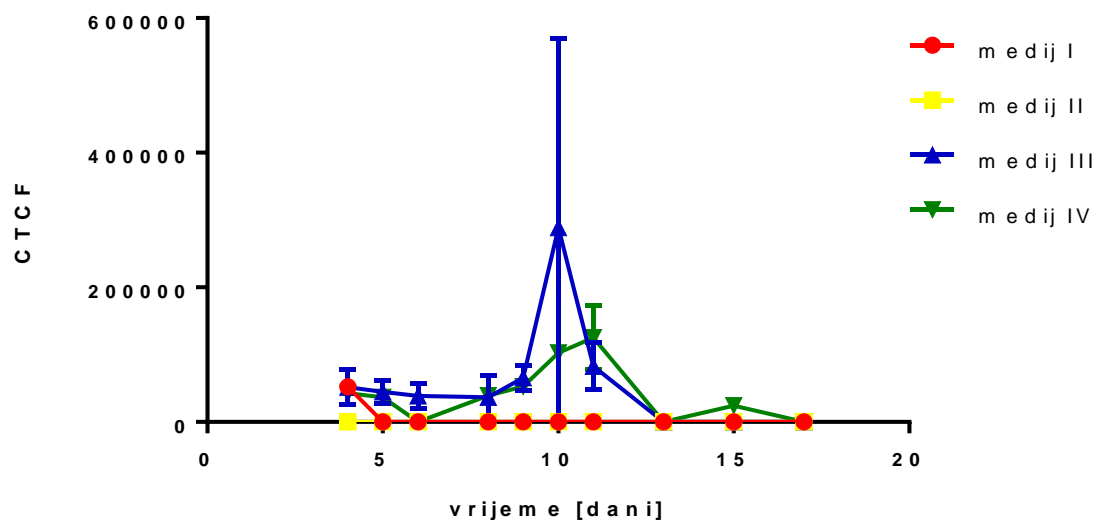
Slika 13. Neuralne matične stanice su nakon diferencijacije pokazivale ekspresiju proteina TuroboLuc s plazmida pNFH-TurboLuc. A Primjer stanice s morfologijom neurona. **B** Primjer stanica s morfologijom netipičnom za neurone. Zabilježeno 11 dana nakon transfekcije. Bijela crta označava skalu od 200 μm .

Ukupni broj fluorescentnih stanica te prosječni intenzitet fluorescencije stanica ukazuju na učinke različitih sastava medija. Najveći broj stanica sa signalom proteina TurboLuc eksprimiranog s plazmida pNFH-TurboLuc zabilježen je peti dan nakon transfekcije stanica. Broj pozitivnih stanica padao je do devetog dana kada je naglo porastao te se zadržao na visokoj razini sljedeća tri dana (od devetog do jedanaestog dana nakon transfekcije). Tijekom eksperimenta najveći broj stanica je bilježen u mediju III (kodicionirani medij + suplementi B-27 i N-2). Prosječni intenzitet fluorescencije stanica transfeciranih plazmidom pNFH-TurboLuc također je bio najveći u mediju. Raste od osmog, a maksimum doseže jedanaestog dana nakon transfekcije (**Slika 14**).

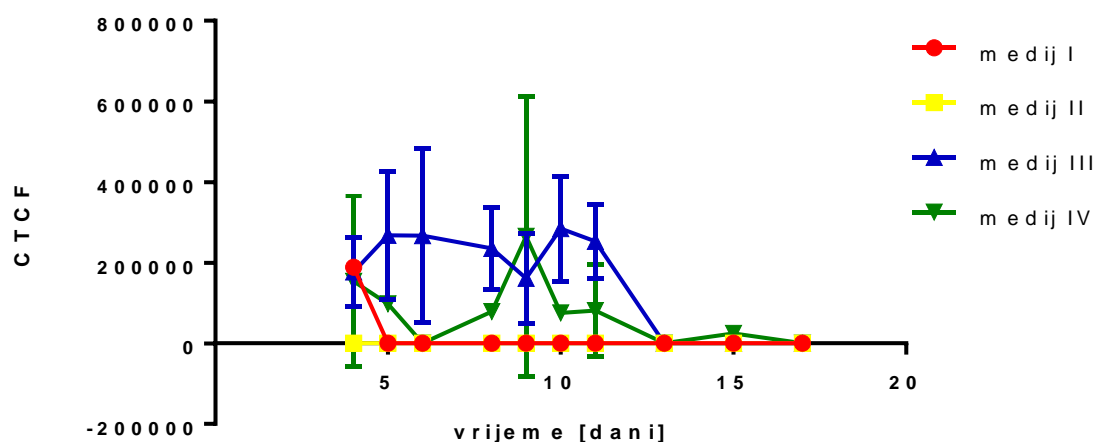
Slično je zabilježeno i kod stanica kotransfeciranih plazmidima pNFH-TurboLuc i pEGFP-N1. Broj stanica koje eksprimiraju protein TurboLuc s plazmida pNFH-TurboLuc najveći je petog dana nakon transfekcije, no ponovno raste od devetog do jedanaestog dana. Najveći prosječni intenzitet fluorescencije proteina TurboLuc eksprimiranog s plazmida pNFH-TurboLuc zabilježen je desetog dana nakon transfekcije u mediju III (kodicionirani medij + suplementi B-27 i N-2) (**Slika 15**). Prosječni intenzitet fluorescencije proteina EGFP ne prati jednak trend: rast je zabilježen u mediju IV (kodicionirani medij + N-2, bez suplementa B-27) od osmog do desetog dana. No, uz iznimku devetog dana, prosječni intenzitet fluorescencije je najviši u mediju III (**Slika 16**).



Slika 14. Prosječni intenzitet fluorescencije proteina TurboLuc u stanicama transfeciranim plazmidom pNFH-TurboLuc je najveći u mediju III. Stanice u mediju sastava III (kodicionirani medij + suplementi B-27 i N-2) imaju najveći prosječni intenzitet fluorescencije 11 dana nakon transfekcije.



Slika 15. Prosječni intenzitet fluorescencije proteina TurboLuc u stanicama kotransfeciranim plazmidima pNFH-TurboLuc i pEGFP-N1 je najveći u mediju III. Stanice u mediju sastava III (kodicionirani medij + suplementi B-27 i N-2) imaju najveći prosječni intenzitet fluorescencije 10 dana nakon transfekcije.



Slika 16. Prosječni intenzitet fluorescencije proteina EGFP u stanicama kotransfeciranim plazmidima pNFH-TurboLuc i pEGFP-N1 je najveći u medijima III i IV. Stanice u mediju sastava III (kondicionirani medij + suplementi B-27 i N-2) imaju najveći prosječni intenzitet, osim devetog dana kada stanice u mediju sastava IV (kondicionirani medij + suplement N-2) pokazuju porast intenziteta fluorescentnog signala.

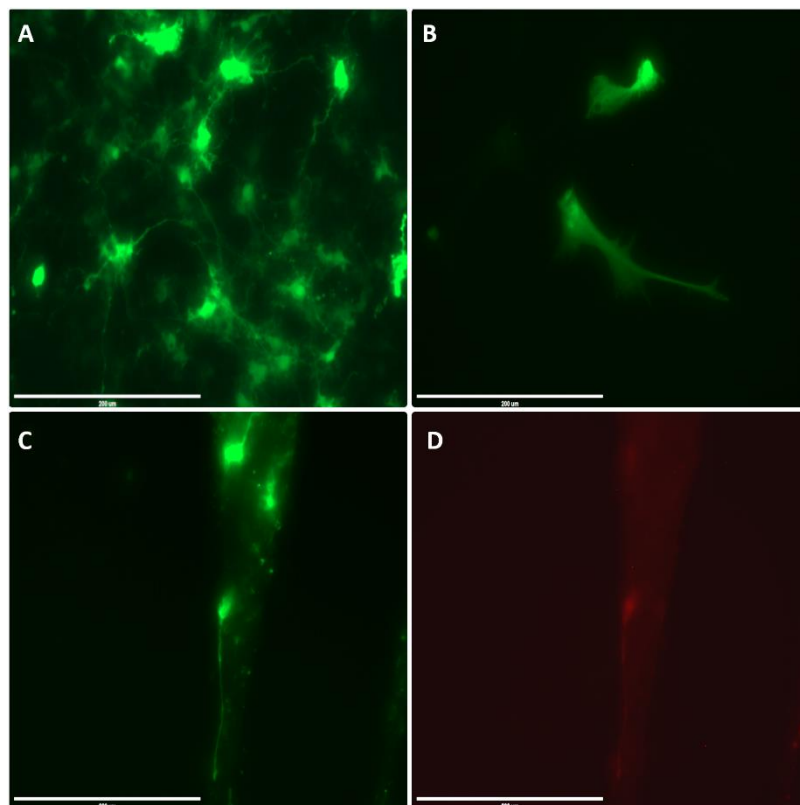
Navedeni rezultati pokazuju kako je za postizanje maksimalne količine proteina eksprimiranog s kontrolnog plazmida pEGFP-N1 potrebno dva dana, dok je ekspresija s plazmida pNFH-TurboLuc najveća petog dana nakon transfekcije. Rast broja stanica s eksprimiranim proteinom TurboLuc te prosječnog intenziteta fluorescencije stanica od devetog do jedanaestog dana nakon transfekcije može se objasniti povećanjem broja diferenciranih stanica u kulturi jer diferencijacija neuralnih matičnih stanica traje od šest do osam dana (Guo i sur. 2012, Louis i Reynolds 2005).

Najveći broj stanica s ekspresijom proteina TurboLuc te najveći prosječni intenzitet fluorescencije stanica zabilježeni su u mediju III (kondicionirani medij + suplement B-27) što se poklapa s morfološkim karakteristikama neurona koje su diferencirane stanice pokazivale u mediju III.

Ekspresija s plazmida nakon transfekcije neuralnih matičnih stanica se mogla detektirati 17 dana nakon transfekcije. Takav rezultat je u skladu s literaturom (Picard i sur. 2017).

Kako bi se potvrdio broj dana potreban za postizanje maksimalne ekspresije s konstruiranog plazmida, 23. dan diferencijacije iste stanice su transfecirane drugi put, jednakim kombinacijama plazmida, prema optimiziranom protokolu. Optimizirani protokol osigurava veću učinkovitost transfekcije, ali negativno utječe na preživljenje stanica.

U 50 % jažica u kojima su stanice uzgajane u mediju broj I (svježe pripravljen medij + suplementi B-27 i N-2), stanice su odumrle 24 h nakon druge transfekcije, a i prije druge transfekcije je najmanji broj stanica bio u tim jažicama. Fluorescentni signal s kontrolnih plazmida pEGFP-1 i pLuc2TurboFP635N je zabilježen 24 h nakon transfekcije. Budući da je korišten optimizirani protokol u odnosu na prvu transfekciju, učinkovitost transfekcije je bila veća. Najviše stanica s pozitivnim signalom zabilježeno je u jažicama u kojima su stanice do druge transfekcije uzgajane u mediju III. Također, stanice uzgajane u mediju broj III su i dalje pokazivale veću razgranatost i dužinu neurita (**Slika 17, A**). Stanice u medijima I (svježe pripravljen medij + suplementi B-27 i N-2) i II (svježe pripravljen medij + suplement N-2) pokazivale su morfologiju tipičnu za glija stanice, a ne neurone (**Slika 17, B**). Fluorescentni signal proteina TurboLuc eksprimiranog s konstrukta pNFH-TurboLuc uočen je 48 h nakon transfekcije. Najveći broj stanica sa signalom proteina eksprimiranih s kontrolnih plazmida i konstrukta pNFH-TurboLuc je uočen u stanicama koje su uzgajane u mediju broj III. Stanice su ukupno praćene devet dana nakon transfekcije, a peti dan je broj stanica sa signalom s konstrukta bio najveći, neovisno o sastavu medija.



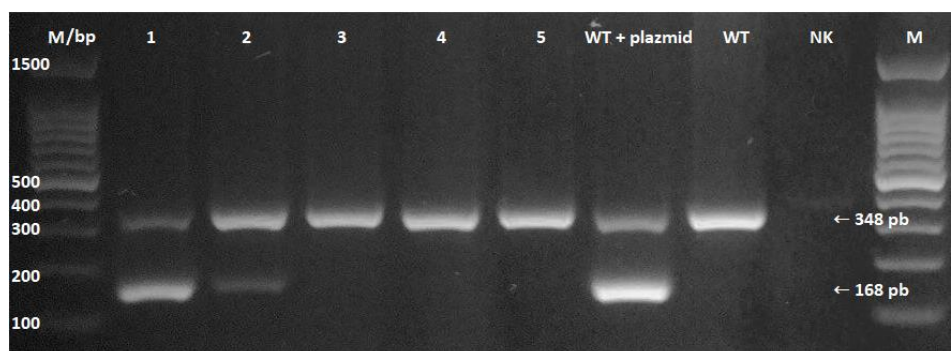
Slika 17. Transfekcija diferenciranih matičnih stanica potvrđuje kako je ekspresija proteina TurboLuc s plazmida pNFH-TurboLuc češća u stanica s morfologijom neurona. Različiti sastavi medija utječu na morfologiju stanica. Fotografije **A** i **B** pokazuju ekspresiju proteina EGFP s plazmida pEGFP-N1, a na fotografijama **C** i **D** su stanice u koje su kotransfekcijom uneseni plazmidi pEGFP-N1 i pNFH-TurboLuc. Na fotografijama **A**, **C** i **D** su stanice uzgajane u mediju III, a na fotografiji **B** su stanice uzgajane u mediju II. Bijela crta označava skalu od 200 μm.

Navedeni rezultati potvrđuju kako je fiziološko stanje stanica tijekom eksperimenta bilo najbolje u mediju III. Odnosno, sastav medija III povoljno je djelovao na diferencijaciju, ali i preživljenje stanica. Druga transfekcija također potvrđuje da je ekspresiju proteina TurboLuc s plazmida pNFH-TurboLuc moguće detektirati 48 h nakon transfekcije diferenciranih stanica, no potrebno je pet dana za postizanje maksimalne razine ekspresije. U ponovljenom eksperimentu nije zabilježen ponovni rast razine ekspresije devet dana nakon transfekcije što je u skladu s pretpostavkom da se porast broja fluorescentnih stanica i prosječnog intenziteta fluorescentnog signala dogodio u prvom eksperimentu zbog porasta broja diferenciranih stanica.

4.5. Genotipizacijom je utvrđeno postojanje tri osnivača transgenične linije

Pronuklearnom injekcijom u komercijalnoj instituciji transgenična kazeta je unešena u 200 embrija mišje linije C57BL/6J. Nakon implantacije embrija u pseudotrudne ženke koje su surogat majke te 18 dana gestacije, rođen je 41 mladunac. Kako bi se među novorođenim mladuncima probrali transgenični, optimizirana je i primijenjena lančana reakcija polimerazom. PCR-om je nakon izolacije genomske DNA novorođenih miševa ispitana prisutnost četiri različita dijela transgenične kazete u genomu mladunaca.

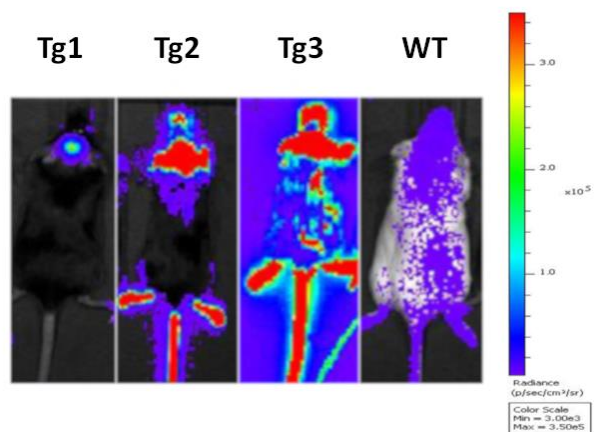
Optimizacijom genotipizacije je utvrđeno kako je PCR-om s dizajniranim početnicama moguće detektirati količinu konstrukta koja odgovara jednoj kopiji transgena u mišjem genomu. Nakon što je dostavljen na Hrvatski institut za istraživanje mozga, iz bioptata generacije F0 je uspješno izolirana genomska DNA što je utvrđeno spektrofotometrijskim mjerenjem koncentracije i čistoće izolirane DNA. Od 41 pristiglih uzoraka, DNA tri životinje bila je pozitivna na sva četiri para početnica koje se vežu unutar transgenične kazete: dvije ženke i jedan mužjak. Svi uzorci (41) su pokazivali prisutnost amplikona s endogenog lokusa u mišjem genomu (**Slika 18**). Životinje koje su nosioci transgena su osnivači tri različite transgenične linije (B6-Tg(*Nefh*-Luc2/FP635)1Gaj, B6-Tg(*Nefh*-Luc2/FP635)2Gaj i B6-Tg(*Nefh*-Luc2/FP635)3Gaj) budući je kod svake prisutno jedinstveno mjesto integracije transgena u genom.



Slika 18. Genotipizacijom su detektirana tri transgenična osnivača među 41 rođenih miševa. Na slici je dio rezultata genotipizacije miševa. U jažicama pod brojevima 1 i 2 je dobiven amplikon veličine 168 pb što ukazuje na prisutnost transgena u genomu miševa. Svi uzorci pokazuju prisutnost amplikona veličine 348 pb dobivenog endogenim početnicama što ukazuje na uspješnu izolaciju genomske DNA iz bioptata komadića uški miševa te na uspješnu lančanu reakciju polimerazom. WT + plazmid je pozitivna kontrola (genomska DNA miša linije C57BL/6J + pNFH-TurboLuc), WT je genomska DNA miša linije C57BL/6J, a NK je negativna kontrola koja ne sadrži DNA. Marker molekulskih masa (M) je *BenchTop 100bp DNA Ladder* (Promega).

4.6. Osnivači pokazuju bioluminiscentni signal na lokaciji središnjeg živčanog sustava te perifernih živaca

Nakon što su genotipizacijom identificirana tri osnivača, prisutnost bioluminiscentnog signala je utvrđena optičkim snimanjem *in vivo*. Kao kontrola je korišten divlji tip miša linije C57BL/6J. Sve životinje su snimane istovremeno. D-luciferin prelazi krvno-moždanu barijeru te omogućava vizualizaciju bioluminiscentnih neurona (Zinn i sur. 2008). Prije ubrizgavanja otopine D-luciferina, nije detektiran bioluminiscentni signal (*blank*). Nakon ubrizgavanja otopine D-luciferina, bioluminiscentni signal je detektiran u tri transgenične životinje, no ne i kod kontrolne životinje (**Slika 19**). Lokalizacija i intenzitet signala je bio različit kod svake od životinja: kod jedne ženke signal primijećen samo na području glave (**Slika 19, Tg1**), druga ženka je pokazivala sličnu lokalizaciju signala, no manji intenzitet (**Slika 19, Tg2**), dok je kod mužjaka signal bio najvećeg intenziteta te je bio lokaliziran na području glave, repa i nogu (**Slika 19, Tg3**). Različiti intenzitet signala može biti posljedica različitog broja kopija transgena ili njihove različite razine aktivnosti zbog različitog genomskog konteksta, no može se javiti i zbog razlika u metabolizmu životinja. Vrijeme trajanja bioluminiscencije nije praćeno. Položaj signala odgovara lokaciji središnjeg živčanog sustava, odnosno perifernih živaca gdje se nalaze terminalno diferencirani neuroni za koje se očekuje da budu obilježeni nakon integracije transgenične kazete u genom miše linije C57BL/6J.



Slika 19. Rezultati *in vivo* optičkog snimanja biolumiscencije. Tg1 (B6-Tg(*Nefh*-Luc2/FP635)1Gaj), Tg2 (B6-Tg(*Nefh*-Luc2/FP635)2Gaj) i Tg3 (B6-Tg(*Nefh*-Luc2/FP635)3Gaj) su transgenični osnivači (redom: ženka, ženka, mužjak). WT je kontrolna životinja linije C57BL/6J.

5. RASPRAVA

Genetički preinačene životinje neizostavan su model za proučavanje mehanizama nastanka bolesti te njihovih mogućih tretmana. U svrhu dobivanja nove transgenične linije, dizajnirana je kazeta s transgenom koja omogućuje ekspresiju reportera TurboLuc pod promotorom teške podjedinice neurofilamenata (NFH). Funkcionalnost vektora s transgeničnom kazetom je potvrđena u *in vitro* sustavu. Neuralne matične stanice uspješno su potaknute na diferencijaciju u zrele neurone, a tijekom diferencijacije povećavala se ekspresija proteina TurboLuc s plazmida pNFH-TurboLuc. Uz to, osnivači nove transgenične linije su dobiveni mikroinjekcijom transgena u pronukleus oplođene jajne stanice. Optičko snimanje *in vivo* je pokazalo prisutnost bioluminiscentnog signala kod osnivača na područjima koji odgovaraju lokaciji središnjeg i perifernog živčanog sustava, odnosno terminalno diferenciranih neurona. Rezultati upućuju na uspješno označavanje terminalno diferenciranih neurona reporterom TurboLuc u mišjem modelu.

5.1. Izazovi uporabljenih tehnologija

5.1.1. Ograničenja korištenih *in vitro* modela

Iako je potvrđeno da je uspješno dobiven dizajniran konstrukt, specifičnost ekspresije za neurone je trebalo potvrditi u *in vitro* sustavu. Ekspresija u određenoj staničnoj liniji ne garantira jednak rezultat u transgeničnom mišu. Dok se vektor ne integrira u genom, nije pod utjecajem kompleksnog genomskeg okruženja za razliku od transgena u mišjem genomu. No, negativni rezultati nakon transfekcije mogu ukazivati na probleme s konstruktom (Liu 2013).

U pokusu su korištene stanične linije koje su reprezentativne za epitelno, vezivno i živčano tkivo. Međutim, stanična linija HEK293 podrijetlom iz stanica izoliranih iz bubrega ljudskog embrija pokazuje određena svojstva neurona. Imunocitokemijske metode su pokazale velike količine podjedinica neurofilamenata NFM i NFL te manje količine α -interneksina i NFH u staničnoj liniji HEK293. Zabilježena je prisutnost malog broja stanica sa svojstvima neurona u bubregu tijekom embrionalnog razvoja. Smatra se da su upravo takve stanice uspješno transformirane adenovirusom prilikom uspostavljanja stanične linije HEK293. Alternativna je hipoteza da je transformacija adenovirusom dovela do promjene uređaja za transkripciju čime su stanice poprimile neuralni fenotip. No, ova je hipoteza manje vjerojatna (Shaw i sur. 2002). Navedena otkrića upućuju na zaključak da stanična linija HEK293 nije dobra neneuralna kontrolna stanična linija. Ipak, tijekom eksperimenta nije zabilježena ekspresija proteina TurboLuc u staničnoj liniji HEK293 zbog čega se može pretpostaviti da je razina ekspresije NFH u stanicama premala za detekciju.

Kultura stanica SH-SY5Y se sastoji od suspenzijskih i adherentnih stanica. Prilikom uzgoja stanica obje populacije su održavane, no transfecirana je samo adherentna populacija stanica. Oboje populacije su

vijabilne, no većina istraživanja za eksperimente uzima samo adherentne stanice (Kovalevich i Langford 2013). Nediferencirane stanice SH-SY5Y kontinuirano proliferiraju te eksprimiraju markere nezrelih neurona, ali i neke markere zrelih neurona (Kovalevich i Langford 2013). Staničnu liniju SH-SY5Y moguće je diferencirati u stanice čiji fenotip je sličniji neuronima. NFH se može detektirati i kod diferenciranih i nediferenciranih stanica SH-SY5Y (Shiple i sur. 2017, Kovalevich i Langford 2013). Razina ekspresije NFH ne mijenja se diferencijacijom stanica SH-SY5Y retinoidnom kiselinom (Jahn i sur. 2017). U eksperimentu nije zabilježena ekspresija proteina TurboLuc s plazmida pNFH-TurboLuc u staničnoj liniji SH-SY5Y. Moguće je da je negativan rezultat posljedica neoptimizirane metode transfekcije ili niske razine ekspresije proteina TurboLuc. Uz to, magnetofekcijom neuralnih matičnih stanica utvrđeno je da je za postizanje maksimalne razine ekspresije proteina TurboLuc s plazmida pNFH-TurboLuc potrebno pet dana. Pri transfekciji stanične linije SH-SY5Y taj podatak nije bio poznat te su rezultati praćeni tri dana nakon transfekcije.

5.1.2. Ograničenja odabrane metode genotipizacije osnivača transgenične linije

Osnivači transgenične linije mogu se genotipizirati metodama PCR ili Southern Blot. PCR je jednostavnija i lakša metoda koja zahtjeva manje DNA, no analizom Southern Blot moguće je dobiti više informacija o ugradnji transgena, kao što je informacija o intaktnosti transgena te broju kopija transgena u genomu. Broj integriranih kopija transgena može biti proporcionalan razini ekspresije, no taj slučaj je rijedak (DeMayo i sur. 2012). Uz to, Southern Blot daje manji broj lažno pozitivnih rezultata. Stoga se pri inicijalnom probiru osnivača može koristiti PCR, a u slučaju neočekivano velikog broja pozitivnih miševa, pozitivni miševi se mogu ponovno genotipizirati metodom Southern Blot (Haruyama i sur. 2009). U oba slučaja ključno je primijeniti metode kojima je moguće detektirati i samo jednu kopiju transgena u genomu kao što je učinjeno u ovom radu.

5.1.3. Procjena uspješnosti mikroinjektiranja u pronukleus

Budući da na uspješnost mikroinjektiranja utječe količina injektirane DNA te hidrostatski tlak koji se stvara prilikom injektiranja, bitan je volumen injektiranog medija te koncentracija DNA (DeMayo i sur. 2012). Postotak preživljenja embrija nakon mikroinjektiranja u ovom istraživanju nije poznat, no on obično iznosi 70-80 %. Veći broj upućuje na nisku učinkovitost integracije transgena (DeMayo i sur. 2012). Broj rođenih potomaka iznosi 41 na 200 injektiranih embrija te je u skladu s očekivanim preživljenjem embrija od 25 % (uz pretpostavku da je oko 75 % embrija uspješno injektirano). Broj od tri transgenična osnivača je u skladu s ukupnom učinkovitošću metode koja iznosi 2-4 % (Doyle i sur. 2012).

5.2. Specifičnost ekspresije proteina TurboLuc s plazmida pNFH-TurboLuc za neurone

Neuralne matične stanice se obično održavaju u heterogenim plutajućim agregatima, tzv. neurosferama. Stanice se u središtu neurosfere diferenciraju te svaka neurosfera sadrži neuralne prekursore (Babu i sur. 2007). Tek 1 % neurosfera čine neuralne matične stanice dok ostatak čine neuroni, astrociti i oligodendroglija (Ma i sur. 2015). Uzgoj neurosfere zahtjeva visoke razine faktora rasta EGF, a kroz pasaže stanice počinju reagirati i na bFGF (Keenea i Mehnet 2002). EGF i bFGF, zajedno sa suplementom B-27, djeluju kao supresori diferencijacije te služe za održavanje matičnosti kulture (Babu i sur. 2007). Iako EGF i bFGF ubrzavaju stanični ciklus, čime je lakše uzgojiti veći broj matičnih stanica, gubi se jedno od glavnih obilježja matičnih stanica *in vivo* – spora dioba (Guo i sur. 2012). Interakcijom diferenciranih i nediferenciranih stanica u neurosferama, uslijed izlučivanja parakrinih faktora, dolazi do promocije diferencijacije neuralnih matičnih stanica. Nasađivanjem stanica u jednostanični sloj, stanice postaju izoliranije te su im dostupni svi sastojci medija. Drugim riječima, kultura je homogenija (Babu i sur. 2007). No, uslijed nasađivanja neurosfere u jednostanični sloj, može doći do spontane diferencijacije neuralnih matičnih stanica. Iako oba načina uzgoja imaju svoje prednosti i mane, neurosfere ostaju najčešći način održavanja nediferenciranih neuralnih matičnih stanica u kulturi (Guo i sur. 2012).

Dan prije transfekcije, neurosfere su nasađene u jednostanični sloj te se njihova diferencijacija inducirala uklanjanjem faktora rasta EGF i bFGF iz medija. Nedostatak faktora rasta u mediju započinje diferencijaciju u neurone i glija stanice (Louis i Reynolds 2005, Keenea i Mehnet 2002). Nadalje, u opisanom pokusu stanice su nasađene u četiri medija različitog sastava, a razlike su bile u tome je li medij kondicioniran iz kulture neurosfere te sadrži li suplement B-27. Babu i suradnici (2007) su zaključili da uzgoj neurosfere u mediju sa suplementom N-2 daje veći broj neurona dok suplement B-27 potiče proliferaciju. Stanice koje rastu u kondicioniranom mediju imaju pristup neurotrofičnim faktorima te takav medij maksimizira diferencijacijski potencijal neurosfere. Pri tome je važno koristiti medij iz neurosfere iz niskih pasaža što je bio slučaj u ovom eksperimentu. U odsutnosti kondicioniranog medija i seruma, broj živih stanica opada i neurosfere većinom diferenciraju u astrocite (Narayanan i sur. 2016). Stoga je najpovoljniji rezultat diferencijacije neuralnih matičnih stanica očekivan u kondicioniranom mediju sa suplementom N-2, no bez dodatka suplementa B-27 (medij IV). Ipak, kondicionirani je medij, neovisno o dodatku suplementa B-27, dao stanice s izraženijim neuritima, a kontrolni plazmid je dao najveći prosječni intenzitet fluorescentnog signala proteina EGFP u kondicioniranom mediju. No, najveći broj stanica s fluorescentnim signalom proteina TurboLuc je zabilježen u jažicama s medijem broj III (kondicionirani medij + suplementi N-2 i B-27). Također, najveći prosječni intenzitet fluorescencije proteina TurboLuc je bio u mediju III. Rezultati upućuju na to da je suplement B-27 utjecao na preživljenje i diferencijaciju stanica. No, vidljiv je i učinak samog

kodicioniranog medija na oba procesa. Ipak, za općenite zaključke, eksperiment bi trebalo ponoviti u replikama te bi trebalo uvesti dodatne metode kojima bi se okarakterizirale stanice nakon diferencijacije te točnije odredio njihov broj.

Kao što je spomenuto, uzgojem primarnih neuralnih matičnih stanica u nerospferama dobiva se heterogena populacija stanica. Postoji nekoliko metoda za obogaćivanje kulture neurosfera neuralnim matičnim stanicama. Prve tri navedene metode se provode sortiranjem stanica uz pomoć protočne citometrije. Prva metoda se temelji na uporabi staničnih markera neuralnih matičnih stanica kao što su LeX, CD133, Sydecin-1, Notch-1 i integrin-beta 1. Druga metoda se temelji na izbacivanju boje iz stanica. Populacije stanica koje mogu aktivno izbacivati boju Hoechst 33342 su obogaćene neuralnim matičnim stanicama. Treći kriteriji se temelji na selekciji na temelju morfologije. Neuralne matične stanice se mogu prepoznati po većoj veličini te granularnosti citoplazme. Četvrta metoda uključuje promjenu sastava medija. Dodatkom hondroitin sulfat proteoglikana i apolipoproteina E, potiče se preživljavanje neuralnih matičnih stanica (Narayanan i sur. 2016). Kako bi se zabilježila pojava ekspresije proteina TurboLuc s plazmida pNFH-TurboLuc tijekom diferencijacije neurona, bilo bi poželjno promatrati izolirane neuralne matične stanice. Alternativno, iz kulture neurosfera se mogu izolirati stanice koje eksprimiraju markere tipične za prekursore neurona kao što su Nestin, Pax6, Musashi, ephrin-B1 i Tbr2 (Wang i sur. 2011). U provedenim eksperimentima zabilježena je pojava ekspresije proteina TurboLuc s plazmida pNFH-TurboLuc 48 h nakon što je promjenom medija potaknuta diferencijacija neuralnih matičnih stanica što upućuje na to kako je u kulturi prije promjene medija već bilo stanica u određenom stadiju diferencijacije. Povećanje ekspresije s plazmida pNFH-TurboLuc nakon devetog dana eksperimenta ukazuje da se diferencijacija određenog dijela populacije stanica ipak odvijala tijekom eksperimenta te potvrđuje heterogenost korištenog sustava.

Dodatno, diferencijaciju neuralnih matičnih stanica u određene linije nije moguće u potpunosti kontrolirati (Fujitani i sur. 2017). Iz toga je razloga opisan spektar različitih morfologija diferenciranih neuralnih matičnih stanica očekivan. No, drukčiji sastav medija bi mogao dati veći broj stanica diferenciranih u neurone. Različite grupe su pokazale kako faktor rasta trombocita, neutrofili (NT3 i NT4) te retinoična kiselina mogu potaknuti diferencijaciju neuralnih matičnih stanica (Jandial i sur. 2008). Također, za diferencijaciju se može dodati serum u medij (Narayanan i sur. 2016).

Nisu rađeni eksperimenti kojima bi bila dokazana prisutnost proteina NFH u transfeciranim stanicama. Uz to, broj stanica koje su eksprimirale protein TurboLuc s plazmida pNFH-TurboLuc bio je manji od broja transfeciranih stanica koje su eksprimirale proteine s kontrolnih plazmida, neovisno o tome jesu li stanice kotransfecirane ili ne. Mogući razlog za to nije samo mali broj diferenciranih neurona u kulturi te razlike u aktivnosti promotora. Pokazano je kako neuroni u kulturi ponekad pokazuju prisutnost

velike količine proteina NFM i NFL, no male količine NFH. Razlog za to može biti nedostatak potrebne signalizacije zbog drugačijeg staničnog okoliša (Carden i sur. 1987). Stoga bi bilo poželjno potvrditi da postoji korelacija ekspresije proteina NFH u stanicama u kulturi i proteina TurboLuc s plazmida pNFH-TurboLuc.

Zbog velikog broja stanica koje se koriste u eksperimentu te opisane kompleksnosti korištenog *in vitro* sustava, nije iznenađujuće naći stanice s željenim obrascem ekspresije (Liu 2013). Stoga, ekspresija proteina TurboLuc s plazmida pNFH-TurboLuc, premda opisana tijekom diferencijacije neuralnih matičnih stanica, ne mora vjerno oslikavati aktivnost promotora NFH. Prema nekim od autora, ne postoje primjereni *in vitro* sustavi za istraživanje ekspresije gena neurofilamenata. Na primjer, visoke razine proteina NFL su zabilježene nakon transfekcije plazmida s genomskom sekvencom u mišje fibroblaste, iako je endogeni *Nefl* ostao utišan. Usprkos tome, genomske sekvence gena *Nefl*/NFL podrijetlom iz miša i čovjeka su se pravilno eksprimirale u transgeničnim miševima (Charron i sur. 1995). Dakle, tek će karakterizacija transgenične linije pokazati staničnu specifičnost ekspresije reportera TurboLuc s konstruirane transgenične kazete.

5.3. Daljnja karakterizacija i primjena novostvorenog miša

Prije uporabe transgenične linije u eksperimentima nužna je daljnja karakterizacija osnivača i njihovog potomstva. Zbog različitog mjesta ugradnje transgena te mogućeg postojanja više mjesta ugradnje u genomu, različiti transgenični osnivači mogu imati različite fenotipe. Stoga je poželjno uspostaviti odvojene transgenične linije. Nakon utvrđivanja prijenosa transgena s F0 na F1 generaciju, potrebno je utvrditi postoji li ekspresija transgena u različitim organima miša (Haruyama i sur. 2009). Daljnja karakterizacija transgenične linije uključivat će provjeru ekspresije u mozgu novodobivene mišje linije. Točnije, određivanje ekspresije transgena na razini mRNA i proteina te precizniju lokalizaciju fluorescentnog signala na histološkim preparatima. Provjerit će se i ekspresija proteina TurboLuc u neuralnim matičnim stanicama podrijetlom iz transgeničnog miša u *in vitro* sustavu. Uz to, između transgeničnih miševa i divljeg tipa ne bi trebalo biti razvojnih ili morfoloških razlika. Mogući negativni učinci reportera TurboLuc na razvoj embrija još nisu dovoljno istraženi te će ih trebati ispitati (Mezzanotte i sur. 2014). Također, potrebno je odrediti elektrofiziološke parametre NFH-TurboLuc miša. Fuzija reportera s proteinom NFH može promijeniti elektrofiziološke parametre te utjecati na regeneraciju aksona (Cassereau i sur. 2013). No, takav rezultat se ne očekuje uvođenjem nove transgenične kazete s promotorom NFH. Postojanje tri različita osnivača povećava mogućnost dobivanja željene linije transgeničnih miševa.

Uz ostala opisana ograničenja mikroinjektiranja u pronukleus, nasumična ugradnja transgena može biti izvor mutacija. Budući da većina mutacija recesivna, heterozigotni miševi neće pokazivati mutirani

fenotip. Stoga se planira održavanje heterozigotne linije miševa, iako homozigoti mogu imati veću razinu ekspresije transgena u usporedbi s heterozigotima (Haruyama i sur. 2009).

Miš s bioluminiscentnim i fluorescentnim neuronima može služiti za snimanje *in vivo*, histološke analize te kao izvor stanica za *in vitro* modele. Obilježavanje terminalno diferenciranih neurona reporterom omogućava praćenje diferencijacije neuralnih matičnih stanica stoga će nova linija transgeničnih miševa biti pogodna za istraživanje terapije neuralnim matičnim stanicama.

6. ZAKLJUČAK

- Konstruiran je plazmid pNFH-TurboLuc koji nosi transgeničnu kazetu potrebnu za kreiranje miša s bioluminiscentnim i fluorescentnim neuronima.
- Plazmid pNFH-TurboLuc je umnožen te izoliran iz bakterija *E. coli* soja *XL10 Gold*.
- Nakon transfekcije u stanične linije embrionalnog bubrega čovjeka (HEK293), mišjih fibroblasta (L-929) i neuroblastoma čovjeka (SH-SY5Y), nije detektirana ekspresija proteina TurboLuc s plazmida pNFH-TurboLuc.
- Optimizacijom magnetofekcije neuralnih matičnih stanica nasađenih u jednostanični sloj postignuta je učinkovitost oko 10 %.
- Nakon magnetofekcije plazmida pNFH-TurboLuc u neuralne matične stanice, zabilježen je fluorescentni signal proteina TurboLuc. No, specifičnosti ekspresije transgenične kazete za terminalno diferencirane neurone bit će moguće utvrditi tek na transgeničnoj liniji gdje je transgen ugrađen u genom i pod utjecajem složenog kromatinskog okruženja.
- Probirom miševa rođenih nakon mikroinjektiranja transgena u pronukleus zigote selektirano je tri osnivača transgenične linije.
- Detektiran je bioluminiscentni signal u transgeničnih životinja koji potvrđuje da je transgen ugrađen u genom osnivača te da je reporter TurboLuc eksprimiran. Lokacija signala odgovara poziciji središnjeg živčanog sustava i perifernih živaca gdje se nalaze terminalno diferencirani neuroni.
- Opisani rezultati upućuju na početak uspješne uspostave nove transgenične linije miševa s bioluminiscentnim i fluorescentnim neuronima.

7. LITERATURA

- Abe T., Fujimori T. (2013): Reporter mouse lines for fluorescence imaging. *Dev Growth Differ* **55**: 390-405.
- Babu H., Cheung G., Kettenmann H., Palmer T. D., Kempermann G. (2007): Enriched monolayer precursor cell cultures from micro-dissected adult mouse dentate gyrus yield functional granule cell-like neurons. *PLoS One* **2**: e388.
- Brinster R. L., Chen H. Y., Trumbauer M. E., Yagle M. K., Palmiter R. D. (1985): Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 4438-4442.
- Carden M. J., Trojanowski J. Q., Schlaepfer W. W., Lee V. M. (1987): Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns. *J Neurosci* **7**: 3489-3504.
- Cassereau J., Nicolas G., Lonchamp P., Pinier M., Barthelaix A., Eyer J., Letournel F. (2013): Axonal regeneration is compromised in NFH-LacZ transgenic mice but not in NFH-GFP mice. *Neuroscience* **228**: 101-108.
- Charron G., Guy L. G., Bazinet M., Julien J. P. (1995): Multiple neuron-specific enhancers in the gene coding for the human neurofilament light chain. *J Biol Chem* **270**: 30604-30610.
- Coleman M. S. i McGregor A. (2015): A bright future for bioluminescent imaging in viral research. *Future Virol* **10**: 169-183.
- DeMayo J. L., Wang J., Liang D., Zhang R., DeMayo F. J. (2012): Genetically engineered mice by pronuclear DNA microinjection. *Curr Protoc Mouse Biol* **2**: 245-262.
- Diéguez-Hurtado R., Martín J., Martínez-Corral I., Martínez M. D., Megías D., Olmeda D., Ortega S. (2011): A Cre-reporter transgenic mouse expressing the far-red fluorescent protein Katushka. *Genesis* **49**: 36-45.
- Doyle A., McGarry M. P., Lee N. A., Lee J. J. (2012): The Construction of Transgenic and Gene Knockout/Knockin Mouse Models of Human Disease. *Transgenic Res* **21**: 327-349.
- Engler C., Gruetzner R., Kandzia R., Marillonnet S. (2009): Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes. *PLoS One* **4**: e5553.
- Engler C., Marillonnet S. (2011): Generation of Families of Construct Variants Using Golden Gate Shuffling. U: Lu C. i sur. (ur). *cDNA Libraries: Methods and Applications*. Dordrecht, Springer Science+Business Media. str. 167-181.
- Ericsson A. C., Crim M. J., Franklin C. L. (2013): A brief history of animal modeling. *Mo Med* **110**: 201-205.
- Fujitani M., Huddin N. S., Kawai S., Kanie K., Kiyota Y., Shimizu K., Honda H., Kato R. (2017): Morphology-based non-invasive quantitative prediction of the differentiation status of neural stem cells. *J Biosci Bioeng* **124**: 351-358.
- Gaj T., Gersbach C. A., Barbas C. F. 3rd. (2013): ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* **31**: 397-405.

- Guo W., Patzlaff N. E., Jobe E. M., Zhao X. (2012): Isolation of multipotent neural stem or progenitor cells from both the dentate gyrus and subventricular zone of a single adult mouse. *Nat Protoc* **7**: 2005-2012.
- Hagan C. (2017): In the fight over the CRISPR patent, Jax customers win. (dostupno na: <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2017/january/crispr-patent>).
- Hara-Miyauchi C., Tsuji O., Hanyu A., Okada S., Yasuda A., Fukano T., Akazawa C., Nakamura M., Imamura T., Matsuzaki Y., Okano H. J., Miyawaki A., Okano H. (2012): Bioluminescent system for dynamic imaging of cell and animal behavior. *Biochem Biophys Res Commun* **419**: 188-193.
- Harding J., Roberts R. M., Mirochnitchenko O. (2013): Large animal models for stem cell therapy. *Stem Cell Res Ther* **4**: 23.
- Haruyama N., Cho A., Kulkarni A. B. (2009): Overview: Engineering transgenic constructs and mice. *Curr Protoc Cell Biol* **42**: 19.10.1-19.10.10.
- Ittner L. M., Götz J. (2007): Pronuclear injection for the production of transgenic mice. *Nat Protoc* **2**: 1206-1215.
- Izsvák Z., Ivics Z. (2004): Sleeping beauty transposition: biology and applications for molecular therapy. *Mol Ther* **9**: 147-156.
- Jahn K., WIELTSCH C., Blumer N., Mehlich M., Pathak H., Khan A. Q., Hildebrandt H., Frieling H. (2017): A cell culture model for investigation of synapse influenceability: epigenetics, expression and function of gene targets important for synapse formation and preservation in SH-SY5Y neuroblastoma cells differentiated by retinoic acid. *J Neural Transm* **124**: 1341-1367.
- Jandial R., Singec I., Ames C. P., Snyder E. Y. (2008): Genetic modification of neural stem cells. *Mol Ther* **16**: 450-457.
- Jenkins S. I., Yiu H. H. P., Rosseinsky M. J., Chari D. M. (2014): Magnetic nanoparticles for oligodendrocyte precursor cell transplantation therapies: progress and challenges. *Mol Cell Ther* **2**: 23.
- Kennea N. L., Mehmet H. (2002): Neural stem cells. *J Pathol* **197**: 536-550.
- Kintner C. (2002): Neurogenesis in embryos and in adult neural stem cells. *J Neurosci* **22**: 639-643.
- Kovalevich J., Langford D. (2013): Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol* **1078**: 9-21.
- Kumar T. R., Larson M., Wang H., McDermott J., Bronshteyn I. (2009): Transgenic mouse technology: principles and methods. *Methods Mol Biol* **590**: 335-362.
- Lee M. K., Cleveland D. W. (1996): Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci* **19**: 187-217.
- Liu C. (2013): Strategies for Designing Transgenic DNA Constructs. *Methods Mol Biol* **1027**: 183-201.
- Liu E. T., Bolcun-Filas E., Grass D. S., Lutz C., Murray S., Shultz L., Rosenthal N. (2017): Of mice and CRISPR: The post-CRISPR future of the mouse as a model system for the human condition. *EMBO Rep* **18**: 187-193.
- Louis S. A., Reynolds B. A. (2005): Generation and differentiation of neurospheres from murine embryonic day 14 central nervous system tissue. *Methods Mol Biol* **290**: 265-280.

- Ma Z. Z., Fan L., Huang J. L., Pan X. J. (2015): A novel method to derive and expand mice neural stem cells efficiently without neuro-sphere formation. *Int J Clin Exp Med* **8**: 12834-12841.
- Mezzanotte L., Blankevoort V., Löwik C. W. G. M., Kaijze E. L. (2014): A novel luciferase fusion protein for highly sensitive optical imaging: from single-cell analysis to in vivo whole-body bioluminescence imaging. *Anal Bioanal Chem* **406**: 5727-5734.
- Narayanan G., Yu Y. H., Tham M., Gan H. T., Ramasamy S., Sankaran S., Hariharan S., Ahmed S. (2016): Enumeration of Neural Stem Cells Using Clonal Assays. *J Vis Exp* **116**: e54456.
- Perrot R., Berges R., Bocquet A., Eyer J. (2008): Review of the Multiple Aspects of Neurofilament Functions and their Possible Contribution to Neurodegeneration. *Mol Neurobiol* **38**: 27-65.
- Pickard M. R., Adams C. F., Chari D. M. (2017): Magnetic Nanoparticle-Mediated Gene Delivery to Two- and Three-Dimensional Neural Stem Cell Cultures: Magnet-Assisted Transfection and Multifection Approaches to Enhance Outcomes. *Curr Protoc Stem Cell Biol* **40**: 2D.19.1-2D.19.16.
- Recillas-Targa F., Valadez-Graham V., Farrell C. M. (2004): Prospects and implications of using chromatin insulators in gene therapy and transgenesis. *Bioessays* **26**: 796-807.
- Rülicke T., Hübscher U. (2000): Germ line transformation of mammals by pronuclear microinjection. *Experimental Physiology* **85.6**: 589-601.
- Sato A., Klaunberg B., Tolwani R. (2004): In vivo bioluminescence imaging. *Comp Med* **54**: 631-634.
- Schwartz M. L., Katagi C., Bruce J., Schlaepfer W. W. (1994): Brain-specific enhancement of the mouse neurofilament heavy gene promoter in vitro. *J Biol Chem* **269**: 13444-13450.
- Shaw G., Morse S., Ararat M., Graham F. L. (2002): Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J* **16**: 869-871.
- Shaw G., Weber K. (1982): Differential expression of neurofilament triplet proteins in brain development. *Nature* **298**: 277-279.
- Shcherbo D., Merzlyak E. M., Chepurnykh T. V., Fradkov A. F., Ermakova G. V., Solovieva E. A., Lukyanov K. A., Bogdanova E. A., Zaisky A. G., Lukyanov S., Chudakov D. M. (2007): Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nature Methods* **4**: 741-746.
- Shen B., Zhang J., Wu H., Wang J., Ma K., Li Z., Zhang X., Zhang P., Huang X. (2013): Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Research* **23**: 720-723.
- Shipley M. M., Mangold C. A., Kuny C. V., Szpara M. L. (2014): Differentiated Human SH-SY5Y Cells Provide a Reductionist Model of Herpes Simplex Virus 1 Neurotropism. *J Virol* **91**: 1-19.
- Tang Y., Yu P., Cheng L. (2017): Current progress in the derivation and therapeutic application of neural stem cells. *Cell Death Dis* **8(10)**: e3108.
- Tasic B., Hippenmeyer S., Wang C., Gamboa M., Zong H., Chen-Tsai Y., Luo L. (2011): Site-specific integrase-mediated transgenesis in mice via pronuclear injection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 7902-7907.
- Troy T., Jekic-McMullen D., Sambucetti L., Rice B. (2004): Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminescent reporters in animal models. *Mol Imaging* **3**: 9-23.
- Wang J., Zang H., Young A. G., Qui R., Argalian S., Li X., Wu X., Lemke G., Lu Q. (2011): Transcriptome analysis of neural progenitor cells by a genetic dual reporter strategy. *Stem Cells* **29**: 1589-1600.

Woodard L. E. i Wilson M. H. (2015): piggyBac-ing models and new therapeutic strategies. Trends Biotechnol **33**: 525-33.

Yan B. W., Zhao Y. F., Cao W. G., Li N., Gou K. M. (2013): Mechanism of random integration of foreign DNA in transgenic mice. Transgenic Res **22**: 983.

Yuan A., Rao M. V., Veeranna, Nixon R. A. (2012): Neurofilaments at a glance. J Cell Sci 125 **14**: 3257-3263.

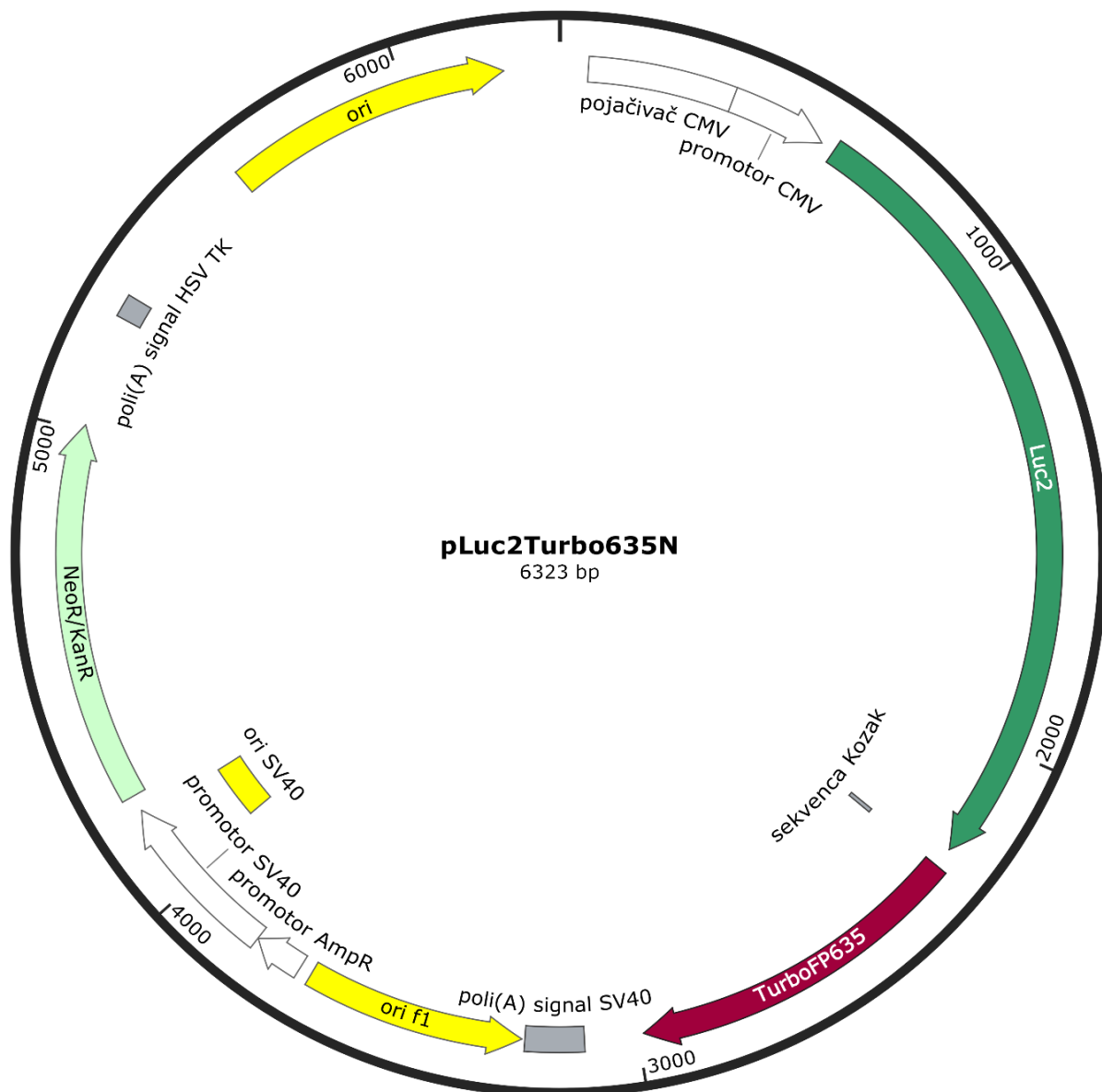
Zhang G. R., Zhao H., Li X., Awasthi S., Geller A. I. (2011): A 16 bp upstream sequence from the rat tyrosine hydroxylase promoter supports long-term expression from a neurofilament promoter, in a helper virus-free HSV-1 vector system. Brain Res **1415**: 109-118.

Zhu Q., Couillard-Després S., Julien J. P. (1997): Delayed maturation of regenerating myelinated axons in mice lacking neurofilaments. Exp Neurol **148**: 299-316.

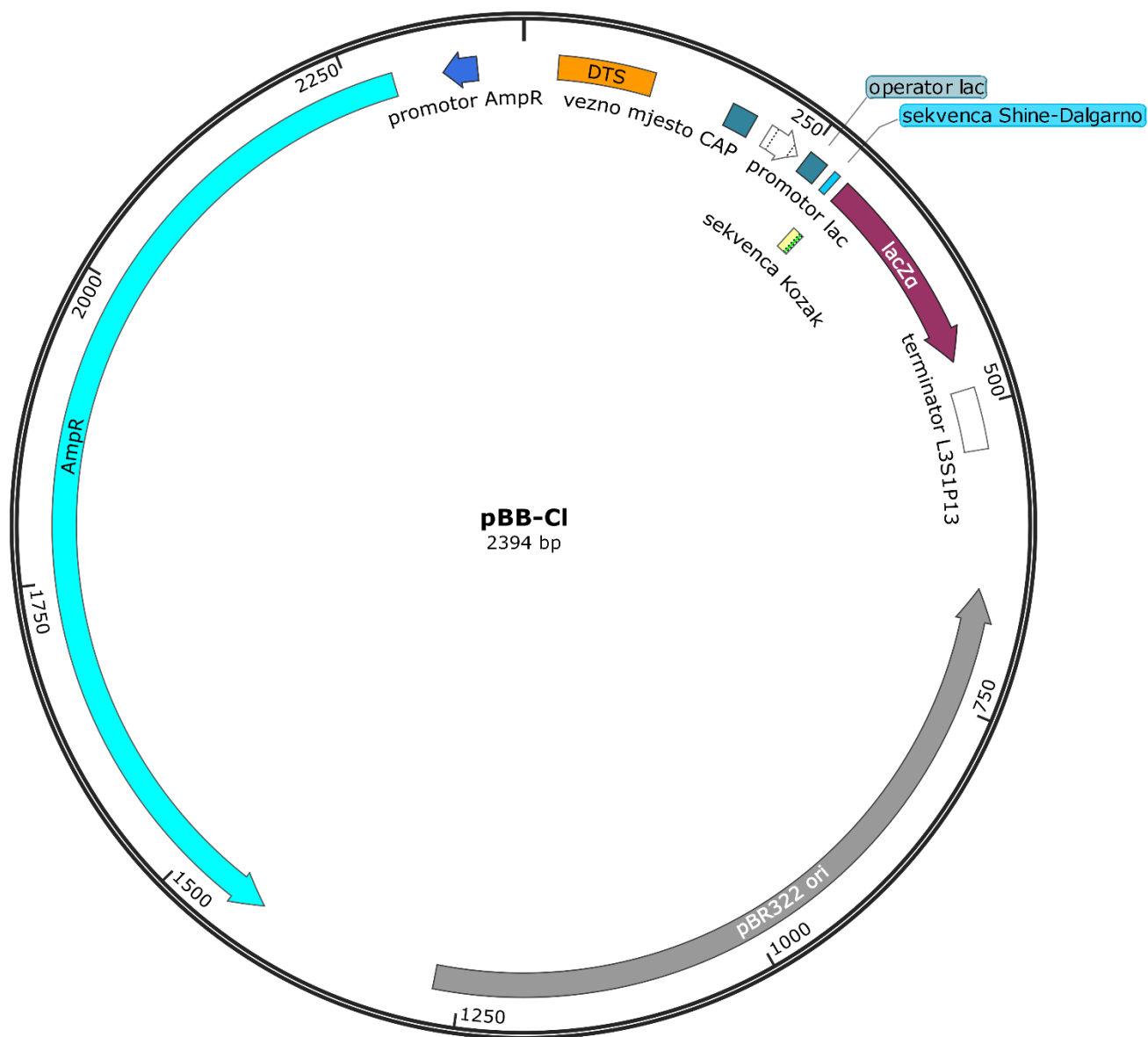
Zinn, K. R., Chaudhuri T. R., Szafran A. A., O'Quinn D., Weaver C., Dugger K., Lamar D., Kesterson R. A., Wang X., Frank S. J. (2008): Noninvasive Bioluminescence Imaging in Small Animals. ILAR J **49**: 103-115.

8. PRILOZI

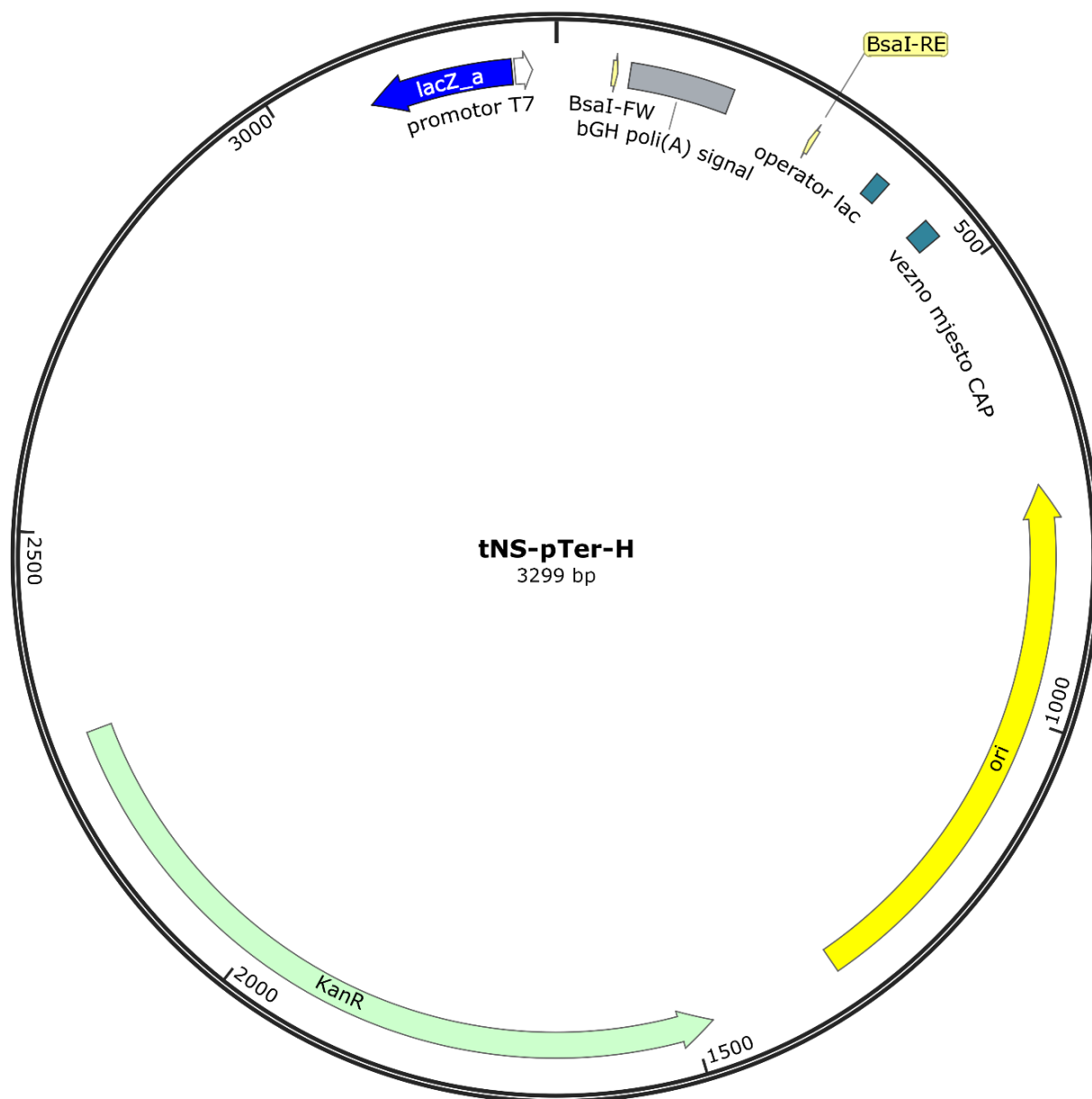
Prilog 1. Mapa plazmida pLuc2Turbo635N



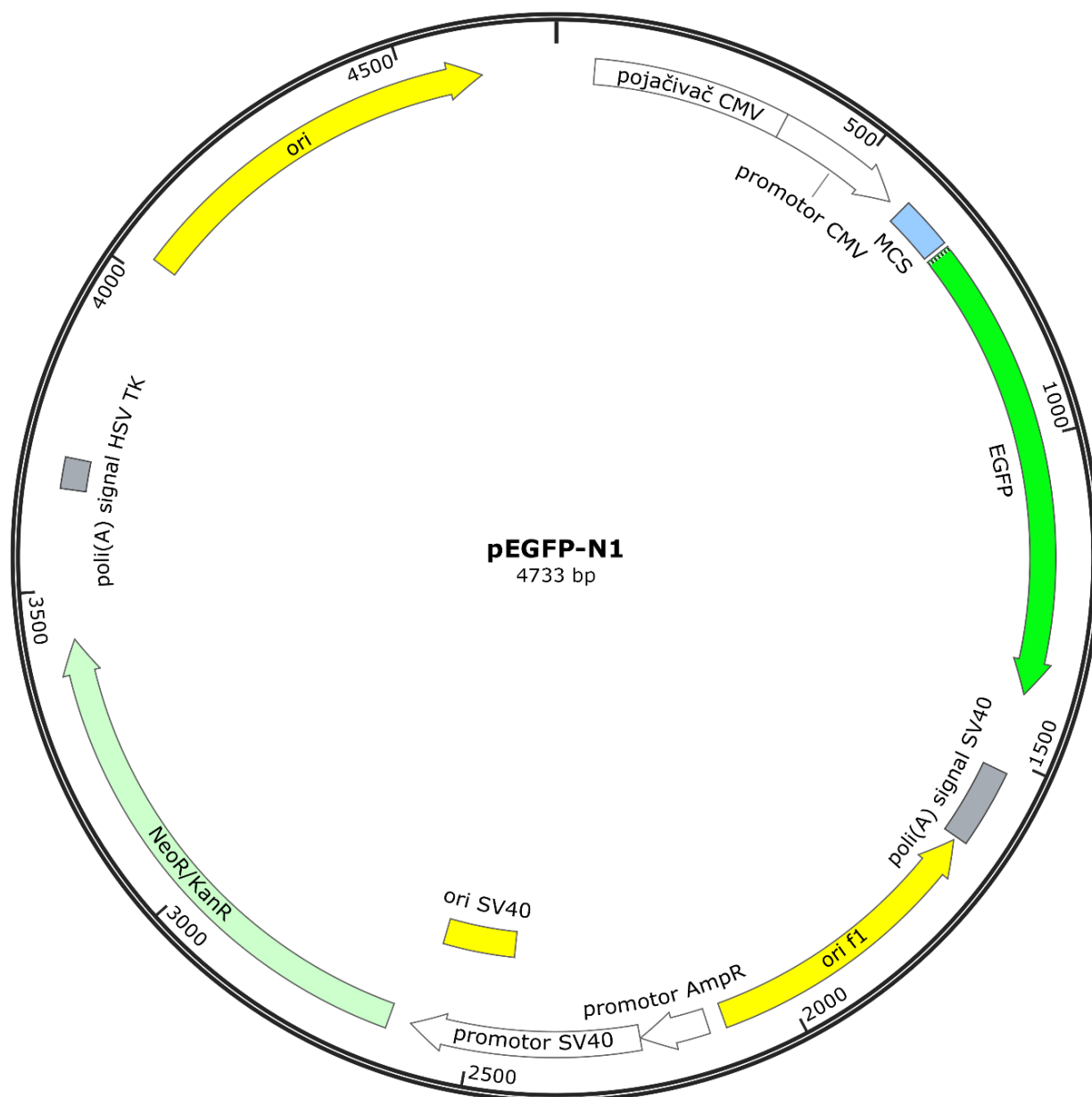
Prilog 2. Mapa plazmida pBB-CI



Prilog 3. Mapa plazmida tNS-pTer-H



Prilog 4. Mapa plazmida pEGFP-N1



9. ŽIVOTOPIS

OBRAZOVANJE

Diplomski studij molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu	rujan 2016. – sada
Preddiplomski studij molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu	rujan 2013. – rujan 2016.
V. gimnazija, Zagreb	rujan 2009. – lipanj 2013.

LABORATORIJSKE STRUČNE PRAKSE

Laboratorij za strukturu i funkciju kromatina, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska	ožujak 2017. – srpanj 2017.
Laboratorij za epigenetiku, Zavod za molekularnu biologiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu	studen 2015. – lipanj 2016.

PREZENTACIJE NA KONGRESIMA

Construction and validation of a vector for generation of transgenic mouse with bioluminescent and fluorescent neurons. Prezentirano na: 22nd Young Neuroscience Meeting; 22 lipnja 2018.; Ljubljana, Slovenija.

Mouse with bioluminescent neurons. Prezentirano na: RECOOP – Frigyes Koranyi Student Science Forum; 9. ožujka 2018.; Budimpešta, Mađarska.

Development of a novel transgenic mouse with bioluminescent neurons for in vivo imaging. Prezentirano na: RECOOP – 8th Annual Project Review Meeting; 19-22 listopada 2017.; Zagreb, Hrvatska.

ZNANJA I VJEŠTINE

Molekularne metode: osnovne molekularne metode (izolacija DNA, PCR, elektroforeza), metode genetičkog inženjerstva (restriksijska digestija, ligacija), stanična kultura (uzgoj stanica, transfekcija)

Programski jezici: R, Python

Strani jezici: engleski (B2), francuski (A1)